

**Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**  
**Igor Oliveira da Silva**

**Estudo da resposta imune na injúria renal aguda no modelo de isquemia  
e reperfusão em animais obesos**

São Paulo

São Paulo  
**Igor Oliveira da Silva**

**Estudo da resposta imune na injúria renal aguda no modelo de isquemia  
e reperfusão em animais obesos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências  
Programa de Nefrologia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia da Conceição Andrade

São Paulo



**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Igor Oliveira da

Estudo da resposta imune na injúria renal aguda no modelo de isquemia e  
reperfusão em animais obesos / Igor Oliveira da Silva. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São  
Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Injúria renal aguda 2.Obesidade 3.Inflamação 4.Estresse  
oxidativo 5.Proteínas Klotho 6.Lipocalina 2.

USP/FM/DBD-170/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi realizado no LIM 12 da Faculdade de Medicina da USP, com auxílio da CAPES.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que me deram o suporte necessário para o meu caminho até aqui e aos meus gatos que estiveram em meu colo nos momentos mais difíceis.

Agradecimento

Meu agradecimento irá começar com a pessoa mais importante em toda a minha jornada, aquela que me aceitou, me acolheu e principalmente me incentivou a continuar sempre com metas cada vez maiores, e essa pessoa é minha orientadora Dra Lúcia Andrade. Cheguei no laboratório LIM 12 pela Dra Camila Eleutério e desde o primeiro dia, a Dra Lúcia me tratou com carinho e respeito mesmo eu sendo um “pirralho” de 18 anos. Mesmo ocupada com suas responsabilidades e reclamando que eu cobro ela mais do que ela me cobra, ela me deu apoio total durante todo o mestrado tornando essa jornada muito mais tranquila do que vi com outros colegas que fizeram faculdade comigo, e devido a isso, sou extremamente grato por ter a honra de poder ser seu aluno e ter estado ao seu lado durante estes longos anos desde minha iniciação. Estou ansioso pelas novas aventuras que iremos desbravar juntos após o mestrado. E eu ainda não esqueci da colistina que “O mundo está te esperando Dr. Igor”.

Agradeço a Dra. Claudia, aquela que mais pegou no meu pé e ao mesmo me ajudou muito durante a iniciação, me viu perdido por não conseguir tocar o trabalho que seria minha iniciação científica e me acolheu como seu aluno para trabalhar com chá verde, e com ela eu aprendi muito, desde gaiolas metabólicas até a como lidar com animais. A Dra. Claudia junto a Dra. Lúcia cuidaram de mim durante toda a iniciação, o que me permitiu chegar no mestrado com uma base boa para tocar meus novos desafios.

Agradeço também ao responsável pelo laboratório LIM 12, Dr. Seguro que não somente me aceitou, como no começo de minha jornada me levava para ver as aulas da graduação para que eu pudesse ser introduzido melhor na disciplina com a qual eu iria trabalhar. Isso realmente foi o pontapé inicial que me ajudou muito.

Agora irei agradecer aquela que eu vejo como uma mãe nessa grande família, pois mesmo eu aprendendo muito com minhas orientadoras, a Mirela foi a pessoa que esteve ao meu lado durante todas as atividades dentro do laboratório. Ela chegou um pouco depois de mim no laboratório, mas certamente foi um anjo na minha vida, pois sempre que eu tinha muita coisa para fazer ela estava lá me apoiando e me dando uma mão extra; me ensinou a usar a bancada e seus instrumentos e também me deu tantas puxadas de orelha que eu não saberia dizer como ainda não perdi nenhuma delas. Ainda hoje me apoia e cuida de mim sempre que pode, ainda me dá broncas se eu merecer e certamente minha jornada até aqui não teria tido metade da diversão se não fossem os eventos e guloseimas que ela faz.

Agora se a Mirela é como uma mãe, certamente minhas amigas Dra. Talita Rojas e Dra. Leticia Urbano seriam como irmãs, pois cheguei no LIM 12 recém feito 18 anos e estava no segundo semestre da graduação em Ciências Biológicas. As duas já haviam passado por tudo o que eu iria passar e durante todo esse tempo, eu trabalhei não somente no meu projeto, mas juntamente com elas, fazendo as atividades diárias do laboratório; aprendendo e descobrindo como é bom trabalhar em um grupo com pessoas as quais você pode confiar. Leticia sempre foi a mais carinhosa comigo, me defendendo e até me mimando um pouco, enquanto a Talita sempre mais rígida e séria (e com razão) me ajudando e cobrando. Talita como braço direito da Dra. Lúcia foi responsável por ajudar diretamente tanto a tocar meu projeto como corrigi-lo. Ela tem um olho excelente para detalhes e aprendi muito observando-a trabalhar. Sou extremamente grato por a ver como uma irmã mais velha com quem, mesmo, às vezes, batendo de frente, posso contar e que vamos achar uma saída juntos.

Outra amiga importante que fiz ao longo desses anos foi a nossa bioterista Denise Ariane com quem passei muito tempo desabafando e reclamando das coisas da vida enquanto lavava as vidrarias. Ela era sempre paciente, certamente me ajudou muito quando cheguei. Ela sempre me fez sentir confortável para falar de tudo dentro ou fora do laboratório já que, inicialmente, por ser novo (tanto em idade como em tempo em pesquisa), me sentia tímido para interagir com todo mundo.

Realmente o trabalho em grupo faz toda a diferença, e ter pessoas passando o mesmo que você para se apoiarem é ainda melhor: Antonio Carlos Parra, Heloisa Jacobina, Nicole Kawakami e Felipe Lima foram essenciais. Com o tempo se tornaram amigos importantíssimos também. Antônio era um menino de rua que eu achei na porta do HC e trouxe para o laboratório... Brincadeiras a parte, ele havia estudado comigo e mesmo sendo dois anos mais novo eu já sabia do seu potencial. Quando soube que ele estava procurando iniciação científica, o trouxe para o laboratório. Falei para a Talita e a Leticia sobre o interesse dele e elas falaram para trazê-lo em algum dia... No dia seguinte recebo o relato que um menino estranho surgiu de shorts dizendo que era um enviado meu! Apesar do começo estranho, ele não apenas se estabeleceu no laboratório como se tornou nosso cirurgião e fez todas as cirurgias do projeto. Nicole e Heloísa são duas amigas da graduação de medicina que não entraram apenas como iniciação científica qualquer; elas entraram ligadas ao trabalho ao qual eu estou defendendo meu mestrado. Elas me ajudaram em tudo,

desde fazer a pesquisa bibliográfica, discutir os artigos e o projeto, até fazer os experimentos, inclusive nos fins de semana. Não posso esquecer que elas também levavam o Antonio e eu nos eventos da medicina quando ficávamos até tarde da noite após um dia inteiro de cirurgias. Como estão no último ano de internato, eu não as vejo com a frequência de antes, mas sempre serei grato por ter tido elas nessa jornada comigo. O Felipe, apesar de pertencer a outro laboratório, surgiu nas nossas vidas e foi muito importante no laboratório, com toda sua excentricidade, ele nos auxiliou nos experimentos de imunohistoquímica. Com o tempo foi criando seu espacinho dentro do nosso grupo e agora mesmo sendo de outro lugar, a gente já o consideramos como um dos nossos.

Agradeço aos meus pais, Aurenny e Zeferino por toda a ajuda e pelo apoio em toda minha jornada; principalmente pela paciência e preocupação. Nós sabemos o quanto esse caminho científico pode gerar dúvidas e preocupações e que para pessoas fora do ambiente acadêmico isso é ainda mais complicado de entender. Mesmo assim, meus pais nunca me restringiram, nunca me desanimaram, e sem entender muito do que eu faço sempre me deram a liberdade e todo o apoio para que eu pudesse seguir em frente sabendo que se lá na frente algo desse errado eu teria com quem contar e ajudar a me reerguer. Não escolhemos nossos pais ao nascer, mas ganhei na loteria da vida por ter eles como meus pais.

Agradeço a disciplina de Nefrologia pela oportunidade de realizar minha pós-graduação e a CAPES pelo apoio financeiro.

E por fim agradeço aos deuses por me permitir conhecer todas essas pessoas maravilhosas e por todas as oportunidades.



***"As flores nascem e depois murcham... as estrelas brilham, mas algum dia se extinguem.... comparado com isso, a vida do homem não é nada mais do que um simples piscar de olhos, um breve momento. Nesse pouco tempo, as pessoas nascem, riem, choram, lutam, são feridas, sentem alegria, tristeza, odeiam alguém, amam alguém. Tudo isso em um só momento."***

***Shaka de Virgem, Cavaleiros do Zodíaco***

## Sumário

Resumo	13
Abstract	15
Justificativa do Projeto	17
Introdução	19
Objetivos	27
Materiais e Métodos	29
Resultados	38
Discussão	59
Conclusão	64
Apêndice	66
Referências	74
Artigo Submetido	80

Resumo

**Oliveira, Igor da S. Estudo da resposta imune na injúria renal aguda no modelo de isquemia e reperfusão em animais obesos [dissertação].** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2023.

**Introdução:** A atual epidemia da obesidade, dado o estilo de vida sedentário e a alimentação intensamente calórica, tem desencadeado consequências à saúde humana como o aumento da incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas, assim como maiores chances de agravamento de episódios agudos, como por exemplo, a Injúria Renal Aguda (IRA). O desenvolvimento de IRA está vinculado a um considerável aumento da mortalidade. O objetivo deste trabalho foi estudar a obesidade como fator agravante da IRA e as possíveis vias patológicas responsáveis.

**Materiais e Métodos:** Para tanto, camundongos C57BL/6J foram alimentados com dieta hiperlipídica ou padrão (40% ou 9,5% de calorias obtidas de lipídeos, respectivamente) por 8 semanas. Metade dos animais foram submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão renal por pinçamento bilateral de 30 minutos dos hilos renais e posterior reperfusão. Os grupos Normal, Obeso, Normal IRA e Obeso IRA foram estudados 48 h após a IRA. **Resultados:** O peso corporal dos animais após 8 semanas apresentou diferença estatística entre os grupos Obeso/Obeso IRA e os grupos Normal//normal/IRA. A mortalidade após a IRA foi de 42% e 25% nos grupos Obeso IRA e Normal IRA, respectivamente; não houve mortes nos grupos que não foram submetidos a IRA. A concentração de NGAL urinário e a presença de necrose tubular no tecido renal estavam significativamente maiores no grupo Obeso IRA. Além disso, foi observado maior infiltrado de macrófagos e maior presença de proliferação celular neste grupo. Os marcadores de estresse oxidativo TBARs e HO-1 também se mostraram aumentados nos animais obesos que sofreram IRA. A expressão de Caspase 3 estava aumentada neste mesmo grupo e expressão de Klotho se encontrava diminuída no grupo Obeso e após a IRA a diminuição foi ainda mais evidente. **Conclusão:** A obesidade foi um fator agravante para o desenvolvimento da IRA em camundongos. O aumento do estresse oxidativo na obesidade pode ser um dos mecanismos envolvidos na maior gravidade da IRA. A proteína Klotho pode ter um efeito terapêutico no tratamento de IRA em indivíduos obesos.

Palavras-chave: Injúria Renal Aguda; Obesidade; Inflamação; Estresse Oxidativo; Proteínas Klotho; Lipocalina 2

## Abstract

**Oliveira, Igor da S. Immune response in a model of ischemia and reperfusion-induced acute kidney injury in obese animals** [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2023.

**Introduction:** The current obesity epidemic, given the sedentary lifestyle and high-calorie diet, has triggered consequences for human health, such as an increased incidence of cardiovascular and metabolic diseases, as well as greater chances of worsening acute episodes, such as, for example, Acute Kidney Injury (AKI). The development of AKI is linked to a considerable increase in mortality. The objective of this work was to study obesity as an aggravating factor of AKI and the possible pathological pathways involved. **Materials and methods:** C57BL/6J mice were fed a high-fat or standard diet (40% or 9.5% of calories obtained from lipids, respectively) for 8 weeks. Half of the animals underwent renal ischemia/reperfusion surgery by 30-minute bilateral clamping of the renal hila and subsequent reperfusion. The Normal, Obese, Normal AKI and Obese AKI groups were studied 48 h after the AKI. **Results:** Body weight after 8 weeks showed a statistical difference between Obese/Obese AKI groups and Normal//Normal/AKI groups. Mortality after AKI was 42% and 25% in Obese AKI and Normal AKI groups, respectively; there were no deaths in the groups that did not undergo AKI. Concentration of urinary NGAL and the presence of tubular necrosis in the renal tissue were significantly higher in Obese AKI group. In addition, a greater infiltration of macrophages and a greater presence of cell proliferation was observed in this group. The oxidative stress markers TBARs and HO-1 were also increased in obese animals that underwent AKI. Caspase 3 expression was increased in this same group and Klotho expression was decreased in the Obese group and after AKI the decrease was even more evident. **Conclusion:** Obesity was an aggravating factor for the development of AKI in mice. Increased oxidative stress in obesity may be one of the mechanisms involved in the greater severity of AKI. Klotho protein may have a therapeutic effect in the treatment of AKI in obese individuals.

Keywords: Acute Kidney Injury; Obesity; Inflammation; Oxidative stress; Klotho proteins; Lipocalin-2.

## Justificativa do Projeto



A obesidade vem crescendo nos últimos anos, tanto no Brasil como no mundo, principalmente nos grandes centros urbanos. Isto se deve, em grande parte, a dieta ocidental, rica em carboidratos, gorduras e alimentos industrializados. Associado à dieta, o sedentarismo e estresse da vida moderna, contribuem para o crescente aumento de peso da população.

O excesso de peso está relacionado ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, hipertensão e até mesmo câncer. Recentemente, estudos mostram relação entre obesidade e doenças renais.

Portanto, neste projeto nos propusemos a estudar a obesidade como fator agravante para a injúria renal aguda e os prováveis mecanismos relacionados.

## Introdução

## Injúria Renal Aguda

A Injúria Renal Aguda (IRA) caracteriza-se pela súbita perda da função renal, relacionada a menor filtração glomerular e a perda da capacidade dos rins de manter a homeostase do indivíduo, com conseqüente acúmulo de compostos nitrogenados e, às vezes, diminuição do volume urinário [1]. A IRA é geralmente multifatorial não possuindo apenas uma causa direta; instabilidade hemodinâmica, sepse e uso de drogas nefrotóxicas são comumente fatores que desencadeiam a patologia. Mas independente da etiologia a IRA é marcada por diferentes processos fisiopatológicos que acontecem simultaneamente e em sequência [2].

Vários mecanismos podem estar envolvidos na fisiopatologia da IRA como disfunção endotelial, alteração da microcirculação, danos tubulares e inflamação.

Na IRA há perda da autorregulação renal, com predomínio de vasoconstrição, independente da causa da IRA. Diversos estudos clínicos observacionais vêm demonstrando uma forte ligação entre disfunção hemodinâmica e o desenvolvimento e progressão da IRA [2]. Alguns desses estudos demonstraram a ligação entre a restauração da pressão arterial média com a melhora no clearance de creatinina, reforçado pela observação que o tempo em que um paciente permanece com pressão baixa durante uma sepse está diretamente ligado ao risco de desenvolver uma IRA [3,4]. Esse risco também foi observado em hipotensão durante cirurgias [5]. Apesar dessas observações demonstrarem um papel importante da hipotensão como importante fator para a IRA, já existem outros estudos tanto em humanos como em animais demonstrando que a IRA pode ocorrer tanto em situações de hipertensão arterial como em fluxo sanguíneo normal [6]. As disfunções da microcirculação intrarrenal também desempenham um papel muito importante [6]. Existem 2 tipos de estruturas microcirculatórias especializadas no rim que são os glomérulos e os capilares peritubulares; os dois possuem um papel crucial na IRA [7]. Como os capilares peritubulares são derivados das arteríolas glomerulares qualquer alteração na pressão arterial glomerular poderá levar a alterações na perfusão dos capilares peritubulares [8]. Doenças inflamatórias como a sepse podem causar alterações nas funções microvasculares resultando em um fluxo heterógeno e lento levando irregularidades no fluxo sanguíneo, provocando micro isquemias ou hipoperfusões regionais mesmo que a perfusão global do rim esteja normal [8, 9].

Outro fator importante no desenvolvimento na IRA é a presença de disfunção endotelial. O endotélio é uma barreira natural entre os espaços intra e extravascular; em condições normais as células endoteliais mantêm a homeostase e integridade da barreira endotelial [10, 11]. Na IRA a disfunção endotelial acontece devido à exposição de uma variedade de mediadores inflamatórios que levam a alteração da permeabilidade, aumento de moléculas de adesão, presença de células inflamatórias e alteração nas proteínas de glicocálice. [12, 13]. Com isso ocorre a formação de microtrombos devido ao acúmulo de aderência dos leucócitos ao endotélio [14, 15]. Além disso, em condições fisiológicas o endotélio é responsável por inibir a coagulação sanguínea devido sua interação com proteínas C e a trombosmodulina. As alterações endoteliais que ocorrem na IRA devido a inflamação levam a um desbalanço desta interação. Assim, durante uma resposta inflamatória, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, muitos dos anticoagulantes são degradados ou menos expressos e as células endoteliais danificadas entram em apoptose aumentando ainda mais a cascata de coagulação [16]. As células tubulares podem morrer por apoptose ou necrose. Células tubulares danificadas pela lesão de hipóxia podem expressar em sua membrana apical os receptores TLR4. A ativação destes receptores ocorre por restos celulares (PAMPs que são padrões moleculares associados a patógenos), acarretando ativação do fator de transcrição NFκ-B e aumentando a produção de citocinas [2]. Inicialmente há um grande infiltrado inflamatório como neutrófilos, macrófagos com fenótipo M1, linfócitos CD4 e CD8, além de ativação de complemento [2].

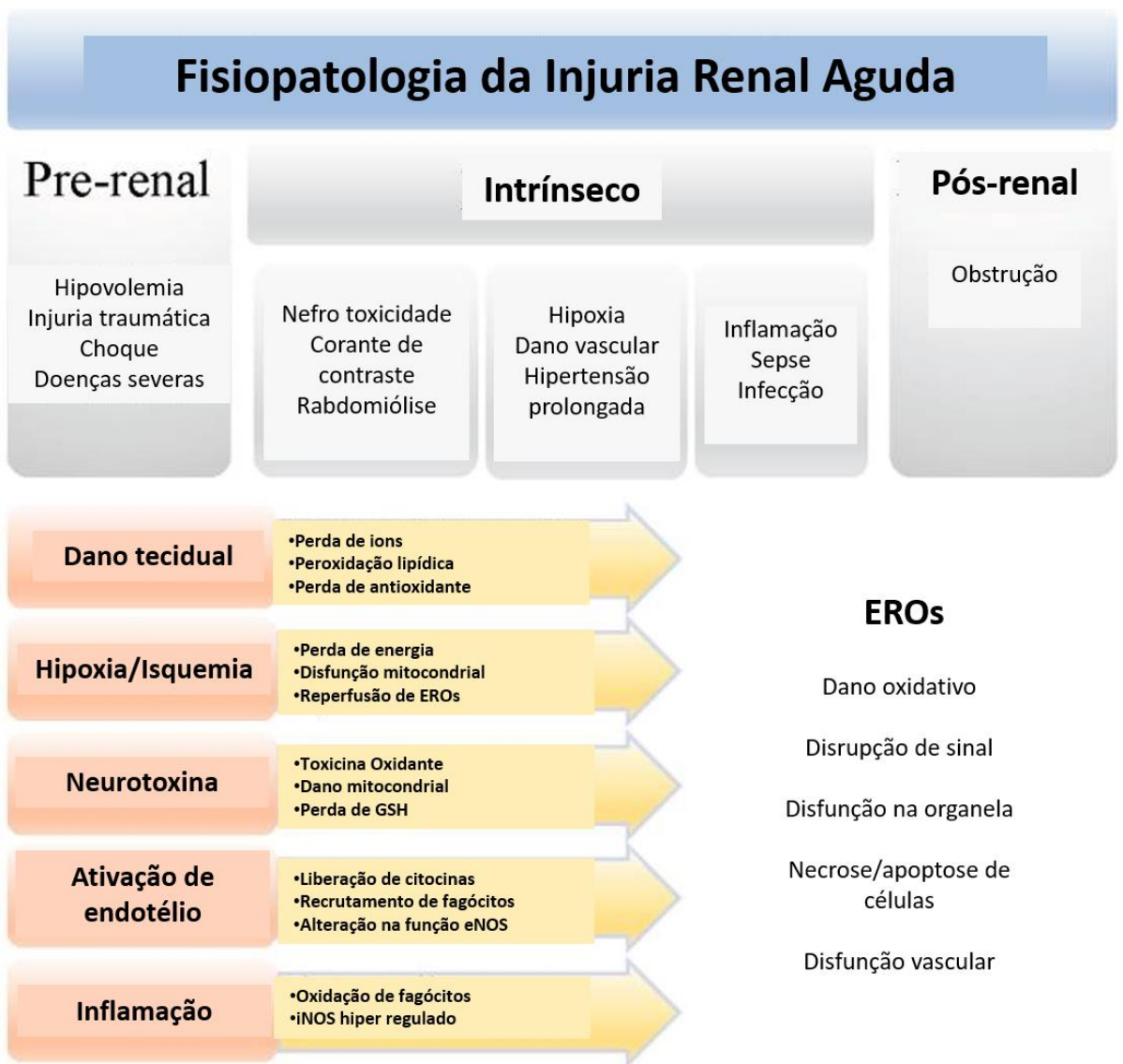


Figura 1: Esquema simplificado da fisiopatologia da injúria renal aguda. Fonte: Imagem adaptada de <sup>[17]</sup>

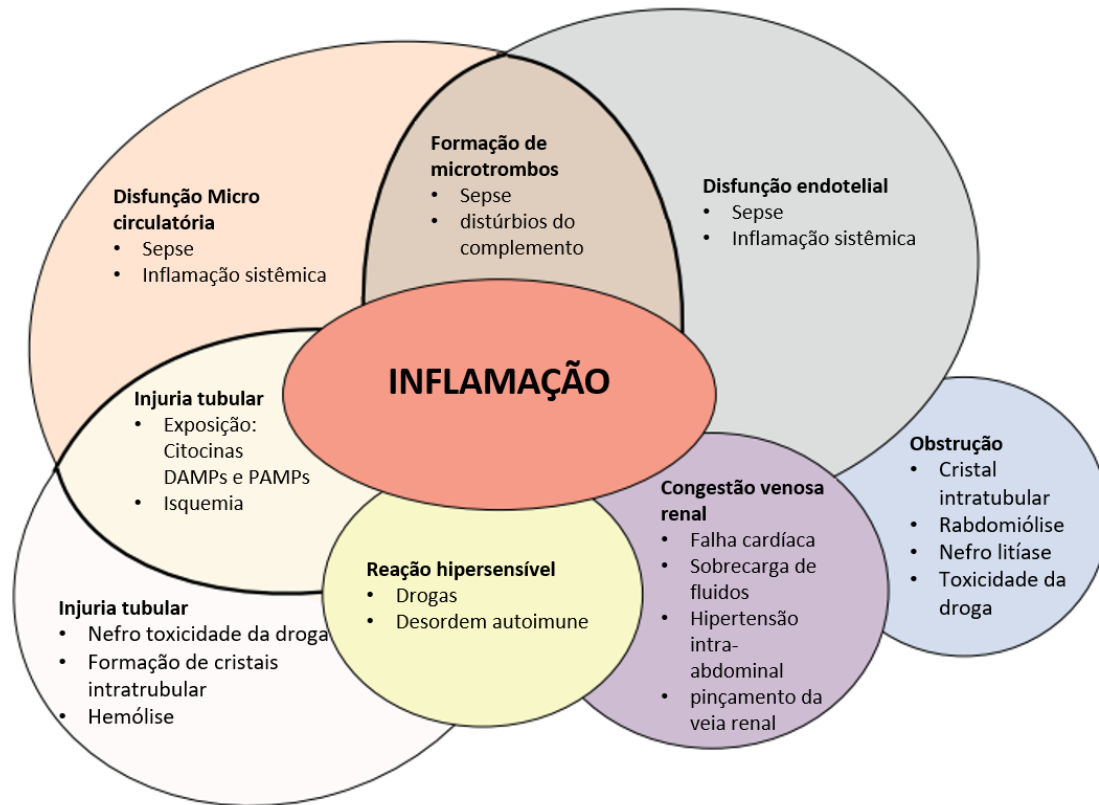


Figura 2: Resumo da fisiopatologia associada a inflamação

### A proteína Klotho

A Klotho é uma proteína antienvhecimento altamente expressa no epitélio tubular renal. Funciona como um correceptor para fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) e atua na homeostase do fosfato [18]. Com o envelhecimento natural ou lesões renais a sua expressão pode diminuir, apesar da Klotho não ser o único ele tem uma importância forte no desenvolvimento de doença crônica renal. Um estudo demonstrou que o uso do peptídeo 1 derivado de Klotho (KP1) bloqueia a formação de fibrose no tecido renal de camundongos interferindo na via de sinalização do TGF- $\beta$ , preservando a função renal, diminuindo a formação de fibrose e aumentando a expressão de Klotho [19]. Vale ressaltar que o TGF-beta possui forte ligação com a expressão de genes ligados à fibrose [20].

## **Estresse oxidativo**

Estresse Oxidativo é o desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante, e leva a uma superprodução de radicais livres de oxigênio ou na produção insuficiente de mecanismo antioxidante [21].

Devido a sua alta capacidade de reabsorção, o rim é o segundo órgão a ter o maior consumo de  $O_2$  (proveniente da respiração) devido a necessidade de produção constante de ATP para o correto funcionamento dos mecanismos reabsorção de cerca de 99% dos filtrados do sangue, sendo que a entrega de  $O_2$  é maior que a demanda metabólica [22]. Nesse processo, o  $O_2$  é reduzido a água, mas uma pequena parte do oxigênio é reduzido a  $O_2^-$  (superóxido) [21]. Radicais livres de oxigênio como os superóxido e espécies reativa de oxigênio (EROs) normalmente se desenvolveram para o metabolismo energético e defesa do hospedeiro, porém quando não há um sistema antioxidativo eficiente para mitigar a ação oxidativa dos EROs e seus danos, pode-se ocorrer apoptose celular [21]. O estresse oxidativo possui um papel importante na fisiopatologia da insuficiência renal e na progressão da doença renal crônica [21].

## **Recuperação da IRA**

Como falamos, na IRA observamos infiltrado inflamatório, ativação de resposta imune inata e adaptativa, além de alterações vasculares, microvasculares e de endotélio. Três a cinco dias depois da instalação da IRA, os macrófagos passam do fenótipo M1, inflamatório, para M2, anti-inflamatório, ocorre aumento da infiltração de linfócitos TREG, e há uma diminuição da expressão de proteínas inibidoras de ciclo celular, havendo, portanto, uma ativação de proliferação celular. A proteína Klotho volta a se expressar, e, portanto, há uma recuperação do epitélio tubular com restabelecimento do endotélio e interstício.

O tempo e a intensidade do insulto estão intimamente relacionados à recuperação ou não da função renal [2]. Uma desadaptação com recuperação parcial pode levar a progressão para doença renal crônica (DRC). Substâncias e proteínas pró-fibróticas resultam em uma reparação adaptativa menor [2]. Alguns fatores como idade avançada, doença renal crônica prévia e um quadro severo de IRA prolongado por corroborar para uma menor reparação adaptativa [54]. Episódios de IRA podem aumentar o risco para DRC, aumento de mortalidade e aumento de reinternações [23].

## Obesidade

A obesidade é definida pela World Health Organization (WHO) como o índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup>, sendo associada como um fator de risco para doenças cardiovasculares e renais, diabetes, alguns cânceres e aumento expressivo da mortalidade. O acúmulo excessivo de gordura normalmente está associado à carga genética do indivíduo, maus hábitos alimentares e/ou disfunções endócrinas.<sup>[24]</sup>

O assunto tornou-se questão de saúde pública após a persistência das altas taxas de obesidade. Se a atual tendência continuar, a obesidade global alcançará 18% em homens e ultrapassará 21% em mulheres e a obesidade mórbida ultrapassará 6% em homens e 9% em mulheres até 2025.<sup>[25]</sup> A prevalência de obesidade em homens aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014 e em mulheres, de 6,4% em 1975 para 14,9% em 2014. No mundo, 2,3% dos homens e 5% das mulheres são classificados como obesos severos (IMC≥35 kg/m<sup>2</sup>).<sup>[25]</sup>

No Brasil, um estudo epidemiológico feito pelo IBGE utilizou-se de variantes de sexo e renda familiar mensal *per capita* para categorizar a prevalência de excesso de peso e obesidade no país, como apresentado na tabela abaixo.<sup>[25]</sup>

**Tabela 1:** Prevalência (%) de sobrepeso e obesidade de acordo com o rendimento<sup>[24]</sup>

Classe de rendimento total familiar mensal <i>per capita</i>	Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade, na população com 20 ou mais anos de idade, por sexo (%)					
	Masculino			Feminino		
	Déficit de peso	Excesso de peso	Obesidade	Déficit de peso	Excesso de peso	Obesidade
Até ¼	2,7	30,9	5,5	5,7	43,8	15,1
Mais de ¼ a ½	3	37	6,9	5	44,2	14,6
Mais de ½ a 1	2,3	43,7	9,6	3,9	47,8	16,3
Mais de 1 a 2	1,9	51,5	13,3	3,8	49,9	18
Mais de 2 a 5	1	58,7	16,1	2,5	49,1	18,1
Mais de 5	0,7	63,2	17,1	2,2	45,7	15,8

Fonte: IBGE, Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), 2008-2009.

Em homens, pode-se observar que o aumento da renda per capita eleva os índices de sobrepeso e de obesidade, enquanto nas mulheres, os índices máximos são vistos em uma renda intermediária.

A obesidade está relacionada com o risco aumentado de doenças crônicas, podendo levar a diversos quadros clínicos. A obesidade androide (excesso de gordura



concentrado na região abdominal), mais frequente no sexo masculino, cursa com complicações cardiovasculares e metabólicas, enquanto a obesidade ginoide (excesso de gordura na região dos quadris), mais frequente no sexo feminino, é mais associada a complicações vasculares periféricas e problemas ortopédicos e estéticos.

[24]

## **IRA e Obesidade**

A obesidade está relacionada ao aumento de estresse oxidativo e inflamação que estão vinculados ao agravamento da IRA. No caso da inflamação, ocorre um desbalanço de citocinas, de forma a intensificar as que são pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  produzidas pelo tecido adiposo branco.<sup>[26]</sup> Já o estresse oxidativo ocorre pela maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em indivíduos obesos, como observado no estudo em que ratos obesos e ratos com peso normal foram submetidos a trauma ortopédico e o grupo obeso apresentou maior produção de EROs e o desenvolvimento de IRA, enquanto que no grupo de peso normal não foi observado tais alterações. Observou-se que altos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo Obeso, podem levar a maior produção de EROs e induzir injúria renal.<sup>[27]</sup>

Esses dois fatores, inflamação e excesso de EROs, estão correlacionados na IRA, uma vez que a ocorrência, por exemplo, de isquemia leva à produção exacerbada de EROs que, por sua vez, causam danos às células tubulares e disfunção vascular, que intensificam a inflamação, formando um quadro típico da patogênese da IRA. Ainda, outras consequências do aumento de EROs na IRA são apresentadas na figura abaixo.<sup>[17]</sup>

## Objetivos

O principal objetivo do estudo foi avaliar se a obesidade agrava a IRA em um modelo de isquemia e reperfusão renal.

Os objetivos secundários foram avaliar quais mecanismos estariam envolvidos no agravamento ou não da IRA.

## Materiais e Métodos

Os camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais ficaram em gaiolas, com acesso livre a água e dieta. O projeto foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Medicina da USP. Número do processo: 1177/2018.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

1. Grupo Normal Controle: animais que receberam 8 semanas de dieta padrão. N=6
2. Grupo Obeso Controle: animais que receberam 8 semanas de dieta hiper lipídica. N=6
3. Grupo Normal IRA: animais que receberam 8 semanas de dieta e, ao final das 8 semanas, foram submetidos a cirurgia de isquemia e reperfusão renal por 30 minutos. N=12
4. Grupo Obeso IRA: animais que receberam 8 semanas de dieta hiper lipídica e, ao final das 8 semanas, foram submetidos a cirurgia de isquemia e reperfusão renal por 30 minutos. N=12

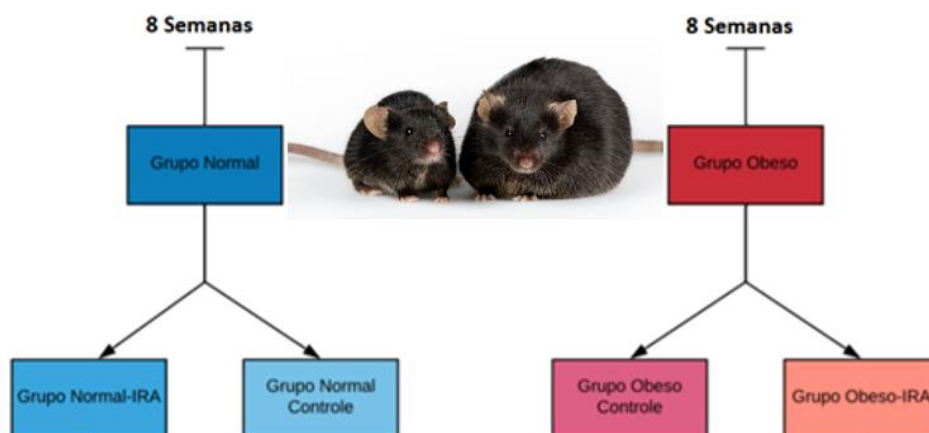


Figura 3: Esquema da distribuição de grupo dos animais.

### **Dietas Normolipídica e Hiperlipídica**

As dietas utilizadas na alimentação dos camundongos foram as seguintes:

Dieta Normolipídica para manutenção de roedores Rhoster RH19521(Rhoster, Araçoiaba da Serra, São Paulo):

- Ingredientes: Amido de Milho, Caseína Láctea, Amido Dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos), Sacarose, Óleo de Soja, Celulose (Fibra), Mix Mineral AIN-93M RH9502, Mix Vitamínico AIN-93 RH9503, L-Cistina, Bitartarato de Colina (41,1% Colina), Tert-Butilidroquinona (TBHQ).

Dieta Hiper Lipídica para roedores Rhoster RH19532 (Rhoster, Araçoiaba da Serra, São Paulo):

- Ingredientes: Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Óleo de Soja, Composto Lácteo, Gordura Vegetal Hidrogenada, Sacarose, Celulose, Mix Mineral RH9501, Mix Vitamínico RH9503, Fosfato de Cálcio bibásico, DL-Metionina, Bitartarato de Colina, Tert-Butilhidroquinona (TBHQ). O perfil aproximado de ácidos graxos da dieta utilizada era de 34% saturados, 29% monoinsaturados e 19% poliinsaturados.

Tabela 2: Perfil nutricional das dietas utilizadas na alimentação dos camundongos.

<b>Perfil Nutricional</b>	<b>Normolipídica</b>	<b>Hiperlipídica</b>
<b>Proteína</b>	13,45%/14,79 kcal%	20,1%/18,8 kcal%
<b>Carboidrato</b>	68,92%/75,76 kcal%	44,3%/41,4 kcal%
<b>Lipídios</b>	3,82%/9,45kcal%	18,9%/39,8 kcal%
<b>Sódio</b>	0,30%	0,38%
<b>Potássio</b>	0,14%	0,16%
<b>Calorias</b>	3,6 kcal/g	4,3 kcal/g

### **Modelo de isquemia e reperfusão**

Para as cirurgias de indução de isquemia renal os camundongos foram anestesiados inicialmente com quetamina 70mg/Kg e xilazina 7mg/Kg intraperitoneal (IP), com suplementação caso necessário.

Após anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia e a incisão mediana abdominal, com dissecação e exposição dos pedículos renais, que foram clampeados para que os rins ficassem isquêmicos. O procedimento foi feito inicialmente no rim direito, sendo repetido no rim esquerdo de cada animal. Após o clampeamento em cada lado, inicia-se a contagem do tempo de isquemia, que foi de 30 minutos.

Durante os 30 minutos de isquemia renal, os animais tiveram suas paredes abdominais provisoriamente aproximadas em plano único e cobertas com gazes

umedecidas com soro fisiológico e, então, colocados em repouso até que se completasse o tempo determinado de isquemia.

Ao final de 30 minutos os clamps foram retirados e a reperfusão se iniciava. Ao final da reperfusão, 1ml de solução salina aquecida foi injetada na cavidade abdominal para reduzir a presença de ar intra-abdominal e a sutura final da parede abdominal, em 2 planos, foi realizada com pontos contínuos. Todo o procedimento foi feito em cama aquecida.

Após a sutura os animais foram deixados em repouso em gaiolas isoladamente, as gaiolas foram mantidas em manta aquecida para o controle de temperatura dos animais.

Os animais foram mantidos sob vigilância até apresentarem sinais de atividade, nesse momento era aplicado Sulfato de Morfina (peso do animal x 0,003) na região subcutânea para tratamento da dor pós.

### **Estudos de gaiola metabólica e estudos bioquímicos**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas 1 dia após a cirurgia. Antes e após o período de permanência em gaiola, os animais foram pesados e a ingesta hídrica foi medida após as 24h de permanência do animal na gaiola.

Foi realizado o monitoramento de eletrólitos (sódio, potássio, magnésio, fósforo, cálcio, cloro), creatinina e ureia no plasma e na urina. As concentrações de ureia foram dosadas pelo método cinético UV (Cobas C111 da Roche). A creatinina foi dosada utilizando o kit da Labtest Diagnóstica S/A, ref. 35. O sangue e a urina foram coletados para análise de sódio e potássio, dosados pelo aparelho EasyLyte Na/K Analyzer. Os eletrólitos restantes foram dosados por eletrodo de íon seletivo no aparelho ABL800 Flex da Radiometer. A osmolalidade urinária foi medida através de osmômetro (Advanced Osmometer, modelo 3D3) e as medidas de fração de excreção de íons foram feitas da seguinte maneira:

$FE_x = (U_x / P_x) / (U_{Cr} / P_{Cr})$ , onde:

“x” : íon de interesse

$U_x$ : concentração urinária de “x”

Px: concentração plasmática de “x”, na mesma unidade em que foi mensurada a concentração urinária deste íon

UCr: concentração urinária de creatinina em mg/dl

PCr: concentração plasmática de creatinina em mg/dl

## **Eutanásia**

Após as 24h de gaiola metabólica a urina e a água foram mensuradas, e os animais foram submetidos a eutanásia.

Os animais foram, inicialmente, com quetamina 70mg/Kg e xilazina 7mg/Kg intraperitoneal (IP), com suplementação caso necessário. Foi feito corte no peritoneal na linha medial para ter acesso próximo ao diafragma, com uma agulha e seringa, através da parede do diafragma, foi coletado o sangue diretamente do coração dos animais, após esse procedimento foi feita a extração dos dois rins onde um foi cortado e armazenado em solução de formalina 10% e o segundo, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80C para posterior extração de proteína. Ao final do procedimento os animais recebiam uma dose 3 vezes maior da anestesia inicial e, após a verificação do óbito, os corpos eram encaminhados para descarte apropriado pelo serviço da FMUSP.

## **Estudo da expressão de proteínas**

Os tecidos de rim foram congelados em -70°C e homogenizados em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Todo o procedimento foi feito no gelo. O homogenato foi, então, centrifugado a 4000g por 30 minutos a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70 °C para a análise das proteínas. A medida da concentração de proteínas foi feita por método colorimétrico pelo kit de BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific) e analisado no equipamento Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA).



## **Western blot**

As amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody usando sistema de quimiluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com o anticorpo para beta-actina (1:1000, Santa Cruz BiotechnologyInc., CA, EUA) ou glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH, 1:1,000; Sigma-Aldrich).

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- caspase 3 (1:500; ABCAM, Cambridge, UK)
- heme-oxygenase-1 (HO-1, 1:1,000; ABCAM, Cambridge, UK)
- P65 (NFkB, 1:500; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)
- TLR4 (1:1000; ABCAM, Cambridge, UK)
- MNSOD (1:4000; Ann Arbor, Michigan, USA)
- ACE-1 (1:1000; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)
- AT-1 (1:500; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

## **Semi-quantificação das proteínas**

As bandas obtidas nos filmes foram analisadas (Scion Image for Windows, IBM PC), e realizadas a densitometria. As bandas foram normatizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização da actina.

## **Dosagem de TBARS**

O estresse oxidativo foi avaliado determinando os níveis no tecido renal de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador da peroxidação lipídica, através do ensaio do ácido tiobarbitúrico. O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malonaldeído.

Uma alíquota de 0,2 ml foi diluída em água destilada, de modo que a diluição final seja de 1:20. Foi adicionado ácido tricloroacético (ATC) 17,5% e ácido tiobarbitúrico, pH 2. As amostras foram colocadas em banho-maria a 80°C por 20 minutos e, posteriormente, colocadas em gelo. Adicionou-se ácido tricloroacético (ATC) 70% e as amostras foram incubadas por 20 minutos. Então as amostras foram centrifugadas a 2000rpm e a densidade ótica do sobrenadante foi lida a 534 nm contra um reagente "blank" em espectrofotômetro. Os níveis teciduais de TBARS nmol/mg/prot <sup>[28]</sup>.

## **Dosagem de NGAL Urinário**

A dosagem de NGAL urinário foi realizada utilizando o kit Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA (R&D System, Minneapolis, MN) de acordo com o protocolo fornecido pelo próprio fabricante.

Depois de colhidas, as amostras de urina de 24 horas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos na velocidade de 4.000g. As amostras e reagentes do kit foram então estabilizados em temperatura ambiente. Foram pipetados 100µl de cada calibrador (curva) e de cada amostra diluída (1:160.000) em sua posição correspondente na microplaca e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo da placa foi aspirado e a placa lavada. Foram pipetados 100µl do anticorpo Anti-NGAL biotinilado e incubado por 60 minutos em temperatura ambiente. A microplaca foi novamente aspirada e lavada. Foram pipetados 100µl de HRP-streptavidina e a placa incubada por 60 minutos. Após nova aspiração e lavagem foram pipetados 100µl do substrato TMB em cada poço e a placa incubada e protegida da luz por 10 minutos para desenvolvimento da cor. Foi adicionada a solução de parada, homogeneizando suavemente o conteúdo dos poços na

microplaca. A absorbância foi lida no comprimento de onda 450 nm no aparelho de leitura Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). O resultado da concentração de NGAL nas amostras foi corrigido pela concentração de creatinina urinária.

### **Escore de Lesão e Imuno-histoquímica**

Após a retirada dos rins, foi retirada uma fatia transversal do órgão de cerca de 0,5 cm da região mediana do órgão, de modo a obtermos uma amostra da região medular envolta pela região cortical. As amostras foram fixadas em solução de formalina 10% por 24 horas. Após esse período, a solução foi substituída por álcool 70%. Posteriormente, o tecido foi embebido em parafina, cortado em secções de 4 µm e fixados em lâminas. Para as análises de imuno-histoquímica os cortes foram desparafinizados e submetido à reação de imunohistoquímica como a seguir. As ligações inespecíficas foram bloqueadas em solução de PBS contendo albumina bovina 1% e leite em pó desnatado a 2% por 30 minutos. Os cortes renais foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução de PBS com mix de bloqueio de albumina bovina 1% + leite em pó desnatado 2%. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e a cor foi desenvolvida com DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris. A contagem foi realizada em 20 campos (0.087mm<sup>2</sup>) e examinados sob microscopia de luz em 40x.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- anti-macrophage cell-surface protein 2 (anti-Mac-2, 1:300; Cerdalene Labs, Burlington, CA, USA);
- anti-Klotho (1:300; ABCAM, Cambridge, UK);
- anti-PCNA (1:1,000; ABCAM, Cambridge, UK));
- anti-adiponectina (1:300; ABCAM, Cambridge, UK)).

Para a análise de escore de lesão as lâminas foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina-eosina (HE) e enviadas para análise. A análise histológica dos tecidos foi realizada pelo grupo de patologia da Amsterdam University Medical

Centers (Amsterdam UMC) com o médico responsável Joris J. Roelofs (análise cega) utilizando o método de Escore de lesão renal<sup>[29]</sup>. Foi avaliada a presença e extensão da lesão tubular, observando aspectos comuns como a existência de necrose, dilatação, deposição de restos celulares e perda da borda em escova. A partir dessa análise houve a classificação de acordo com a extensão do envolvimento da região córtico-medular em 10 campos não sobrepostos escolhidos aleatoriamente (aumento de  $\times 100$ ), em uma escala de 0 a 5, como a seguir:

- 0, ausente;
- 1 de 0 a 10%;
- 2 de 10 a 25%;
- 3 de 25 a 50%;
- 4 de 50 a 75%;
- 5 de 75 a 100%

Os valores totais foram expressos como pontuações de lesão tubular.

### **Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de provas paramétricas empregando-se análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida do teste de Tukey para comparação dos diferentes momentos de avaliação dentro de um mesmo Grupo e o teste de t-Student para a comparação entre Grupos. O grau de significância estabelecido para análise estatística foi de menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

## Peso e eficácia da dieta hiperlipídica

Os animais iniciaram as dietas normo ou hiperlipídica por volta das seis semanas de vida. Os grupos tinham peso semelhante à época, sem diferença estatística entre os grupos. A partir da quarta semana já foi possível observar que o peso dos animais que recebiam dieta hiperlipídica se mostrava significativamente maior que os animais em dieta normolipídica. Essa diferença se manteve ao fim das 8 semanas de dieta.

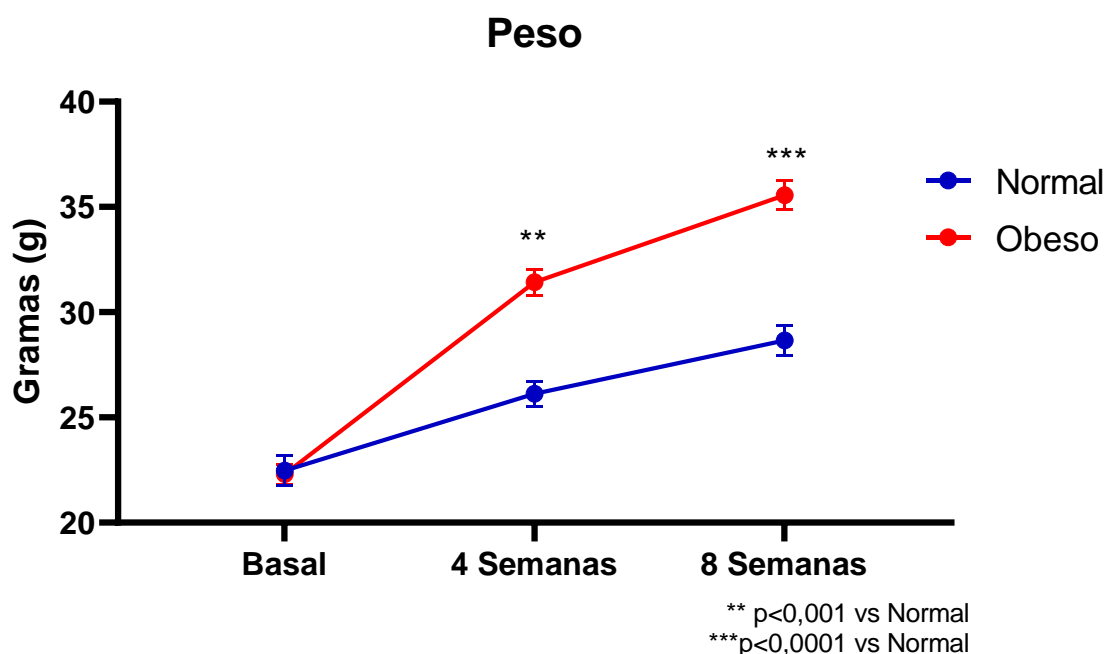


Figura 4: Gráfico da evolução do peso corporal dos animais submetidos a dieta normo ou hiperlipídica.

## Mortalidade

Ao fim das oito semanas de dieta, 2/3 dos animais de cada grupo foram submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão renal. Como era esperado, observamos aumento da mortalidade nos grupos que sofreram IRA. O grupo obeso submetido a cirurgia de I/R apresentou mortalidade significativamente maior que grupo normal submetido a mesma cirurgia.

1. Grupo Normal Controle (n =6): não houve óbitos

2. Grupo Obeso Controle (n =6): não houve óbitos
3. Grupo Normal IRA (n = 12): 3 óbitos (25%)
4. Grupo Obeso IRA (n = 12): 5 óbitos (41,7%)

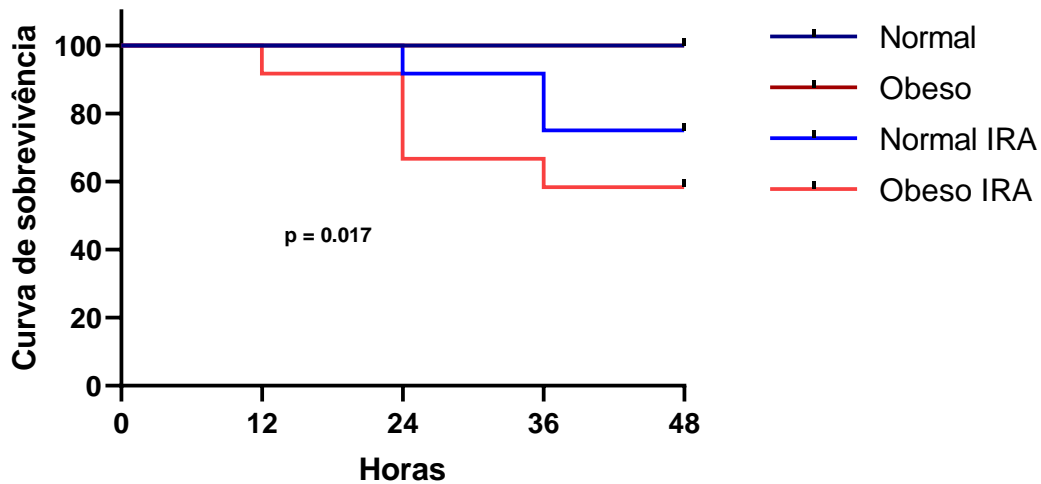


Figura 5: Curva da Mortalidade em 48 horas após a cirurgia de I/R renal.

### Gaiola Metabólica de 24 horas

Foram realizadas três avaliações de gaiola metabólica de 24 horas. A primeira foi realizada, antes do início das dietas normo ou hiperlipídicas. A segunda foi realizada após 4 semanas do início das dietas. A terceira avaliação foi realizada após 8 semanas do início das dietas e 24 horas após a cirurgia de isquemia e reperfusão renal no caso dos grupos IRA. Os grupos controle foram submetidos a esta terceira avaliação após as 8 semanas de dieta. Tabelas individuais dos animais encontram-se no apêndice.

### Dados Metabólicos de 24 horas Pré-Dieta

Não observamos diferença estatística entre os grupos em nenhuma das variáveis (Figura 6).

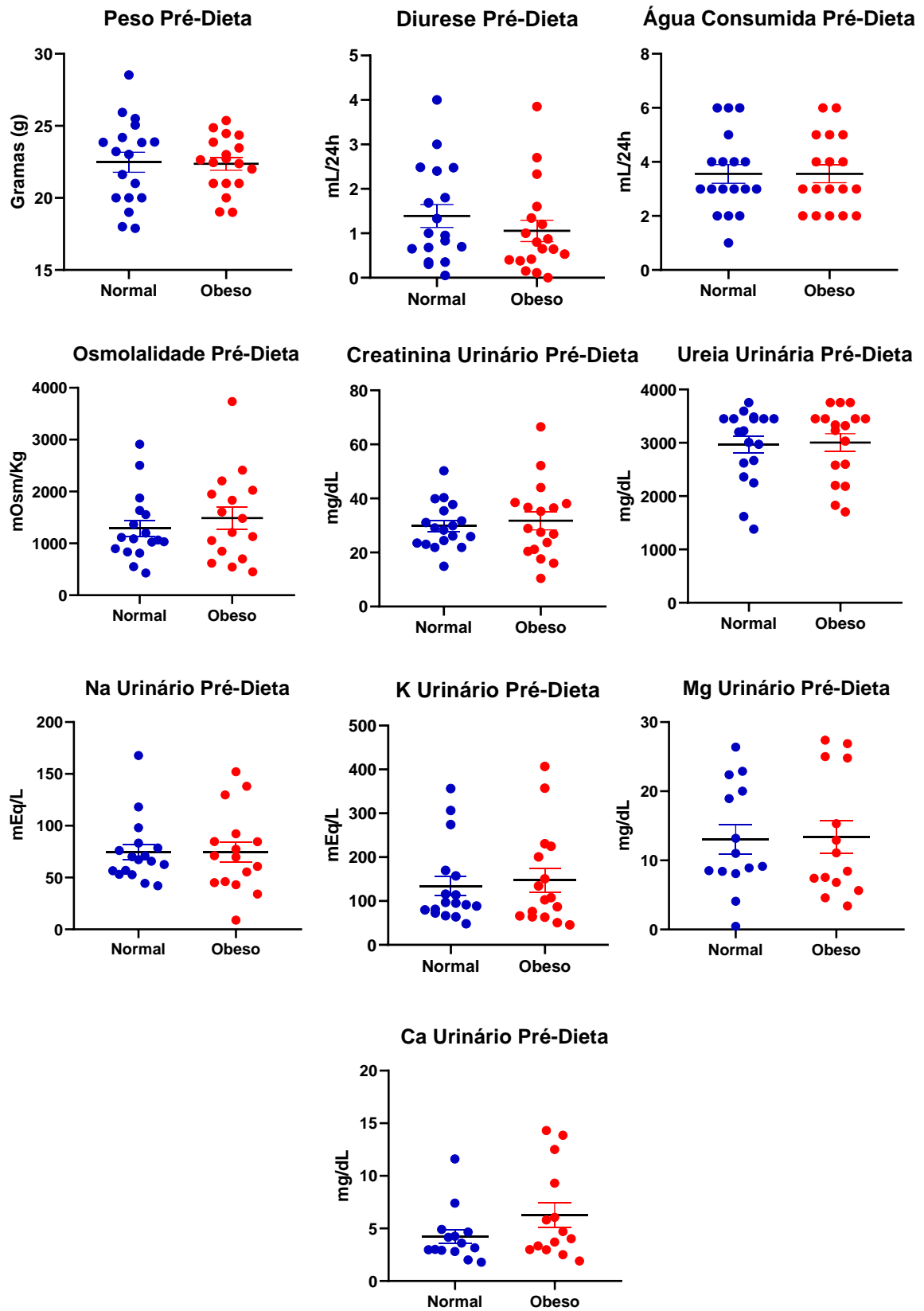


Figura 6: Dados de gaiola metabólica de 24 horas pré-dieta.



## Dados Metabólicos de 24 horas quatro semanas após o início da dieta

Além do peso corpóreo apresentado acima, observamos que os animais do grupo obeso apresentaram uma diminuição na concentração de potássio urinário em relação ao grupo normal. Não observamos diferenças estatísticas em nenhum outro parâmetro verificado.

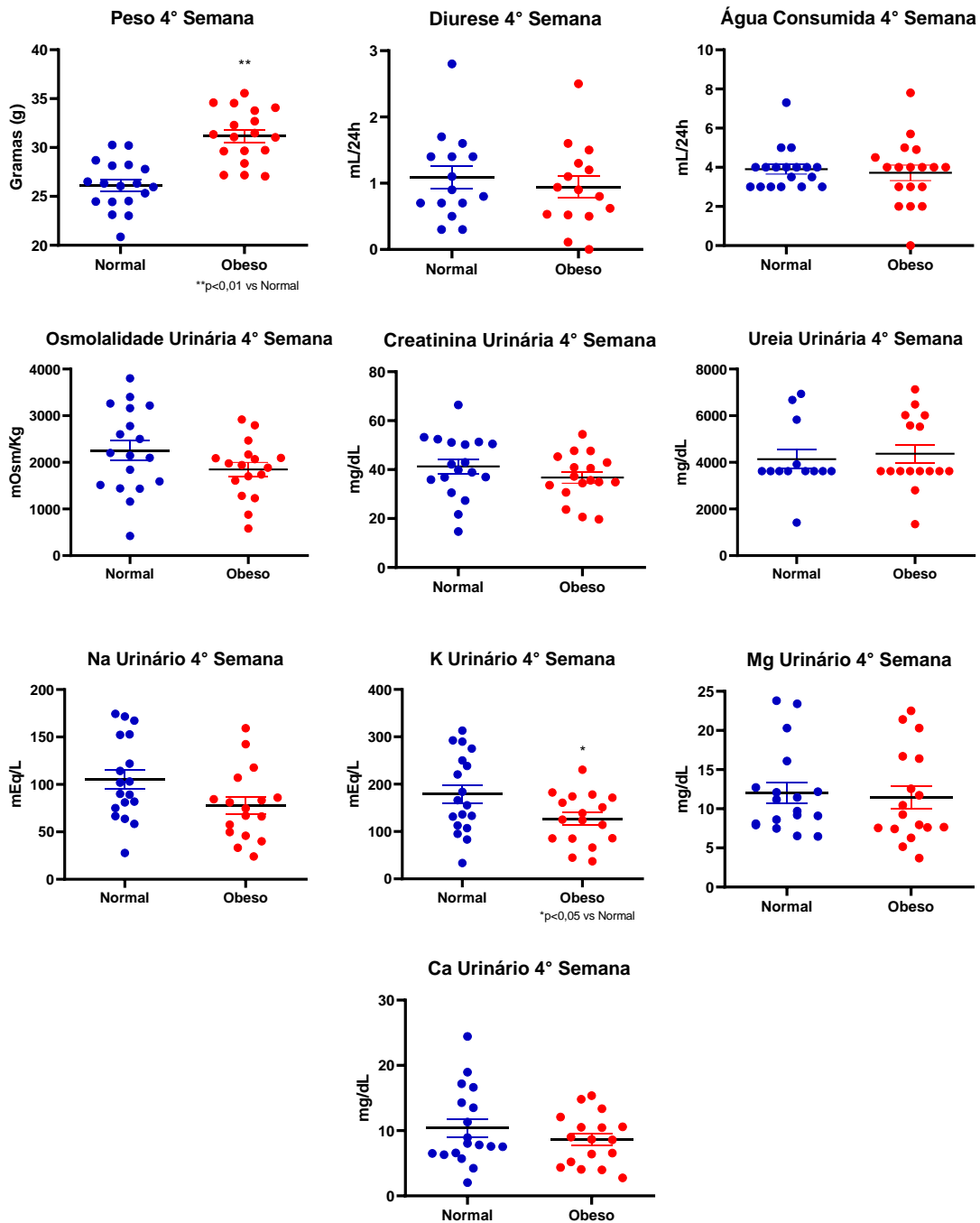


Figura 7: Dados de gaiola metabólica de 24 horas após 4 semanas de dieta normo ou hiper lipídica.

## Dados Metabólicos de 24 horas oito semanas após o início da dieta e 48 horas pós cirurgia de isquemia/reperfusão

Ao fim das oito semanas de dieta, 2/3 dos animais de cada grupo foram submetidos a cirurgia de isquemia e reperfusão renal. Vinte quatro horas após a cirurgia os animais foram colocados em gaiola metabólica por 24 horas. Os animais que não foram submetidos a cirurgia foram colocados na gaiola metabólica logo ao fim das oito semanas de dieta, também por 24 horas.

Como já havíamos observado, o peso dos animais que receberam dieta hiperlipídica estava significativamente maior que os dos grupos em dieta normolipídica. Não observamos perda de peso significativa nos grupos submetidos a cirurgia de i/r renal 48 horas após a cirurgia. Observamos uma diminuição no volume urinário do grupo Normal IRA em relação aos grupos que não foram submetidos a cirurgia. Já a osmolalidade urinária dos animais do grupo Obeso IRA estava diminuída em relação ao do grupo Obeso.

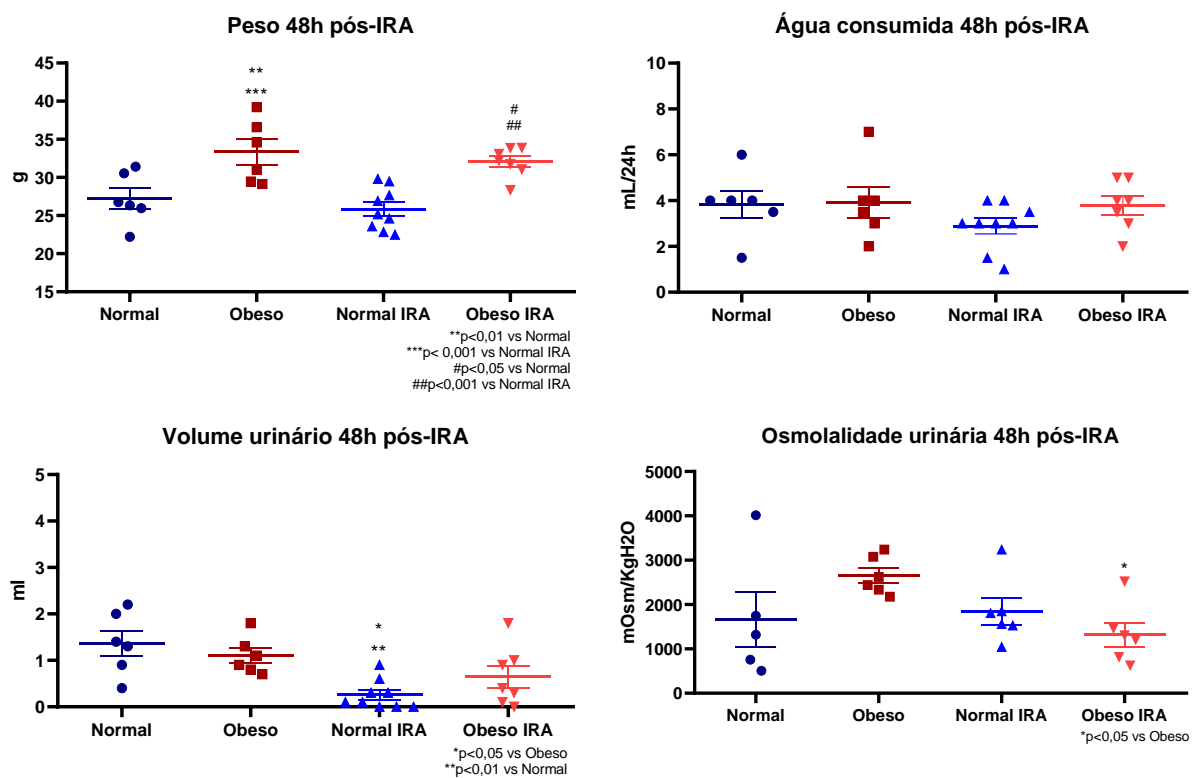


Figura 8: Dados de gaiola metabólica de 24 horas após 48 horas da cirurgia de isquemia/reperfusão renal.

Quarenta e oito horas pós-IRA os grupos não apresentaram diferenças significativas em relação a creatinina, ureia, Na e Mg urinários. Observamos que grupo Obeso IRA apresenta uma concentração urinária diminuída em relação ao grupo Obeso. Além disso, o Ca urinário no grupo Obeso estava aumentado em relação ao grupo Normal e Obeso IRA.

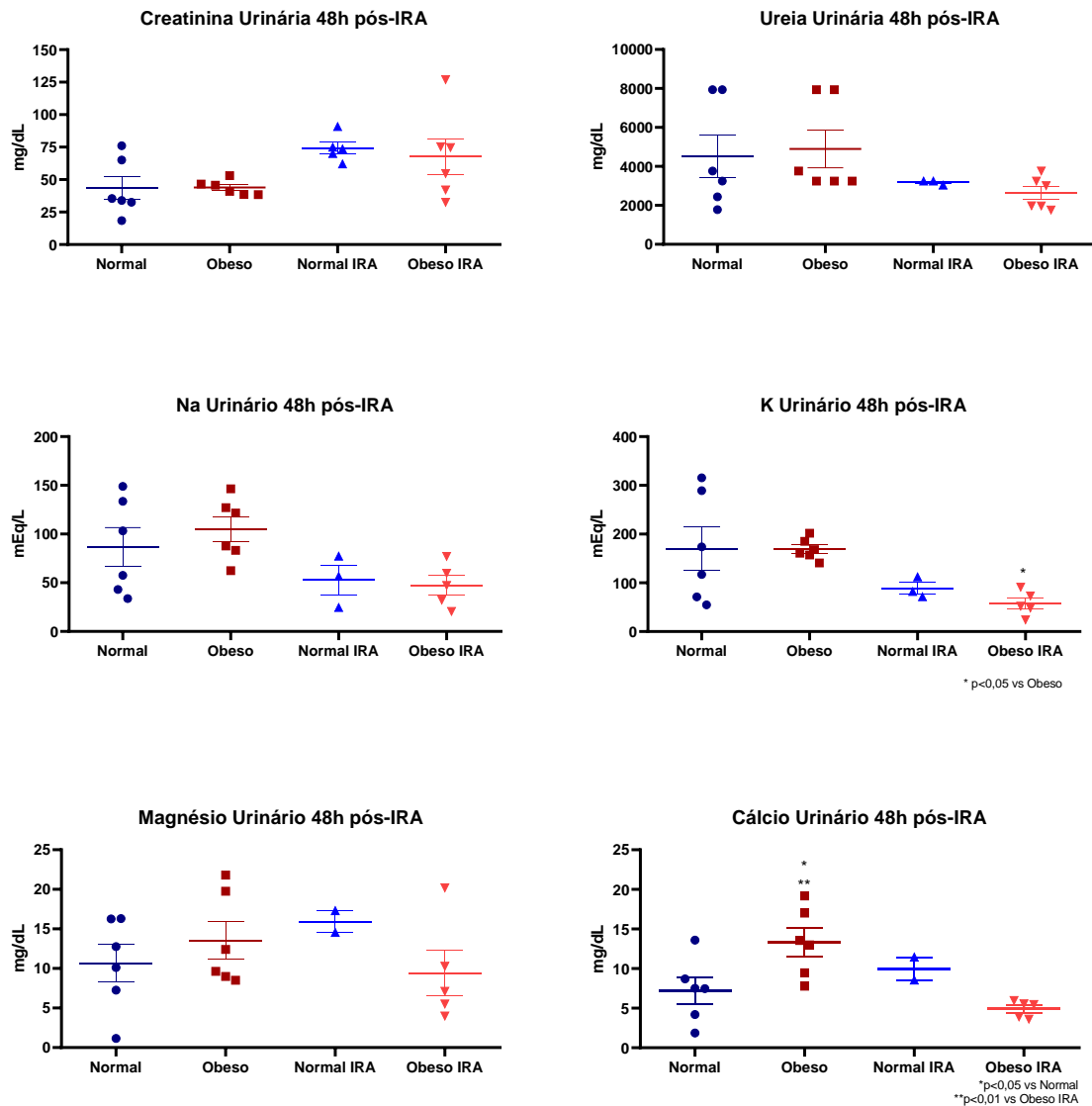


Figura 9: Concentração urinária de eletrólitos 48 horas pós-IRA

Em relação aos eletrólitos plasmáticos dos animais 48 horas pós-IRA, não observamos diferença na concentração de Na, K, Mg e Ca.

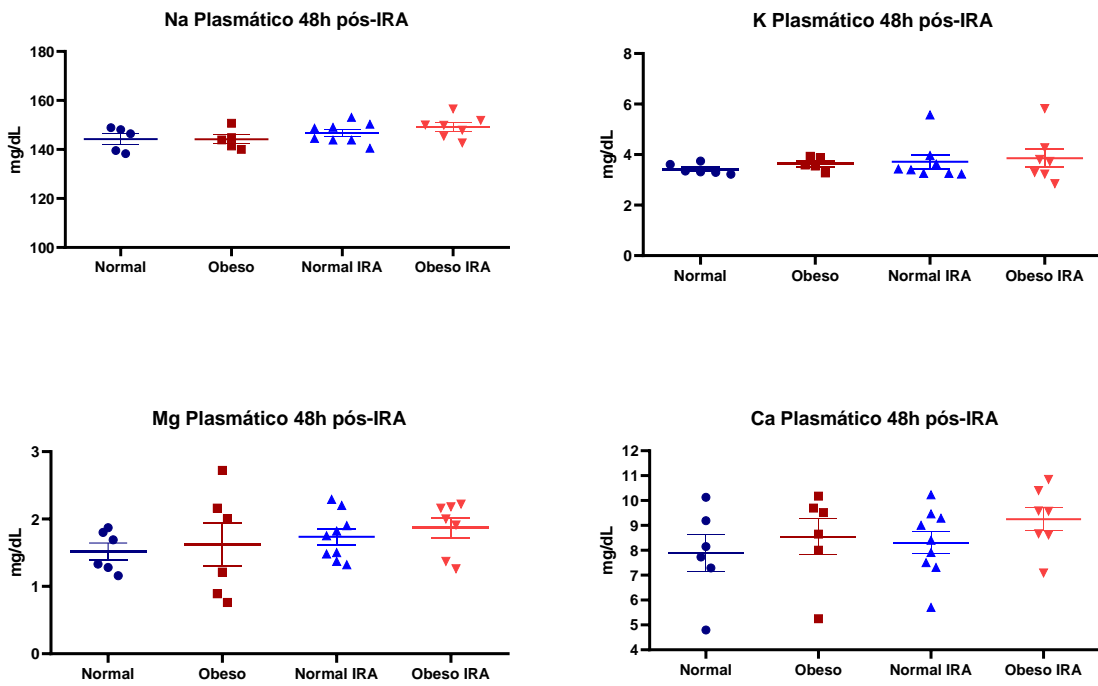


Figura 10: Concentração plasmática de eletrólitos 48 horas pós-IRA.

Devido ao uso da dieta hiperlipídica, julgamos ser necessário avaliar o perfil lipídico e a glicemia dos animais. Não observamos diferença estatística na concentração plasmática de Colesterol, Triglicérides e Glicose plasmáticos.

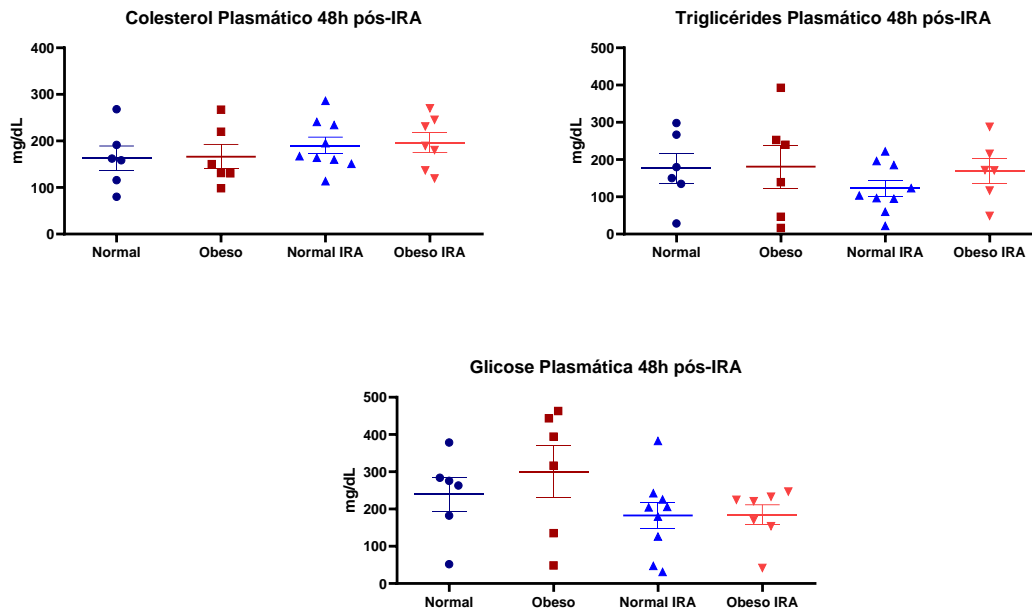


Figura 11: Concentração plasmática de Colesterol, Triglicérides, Glicose 48 horas pós-IRA.

Em relação a função renal dos grupos, não observamos diferenças estatísticas em relação às concentrações plasmáticas de creatinina e ureia. O clearance de creatinina corrigido pelo peso dos animais também não foi diferente estatisticamente entre os grupos.

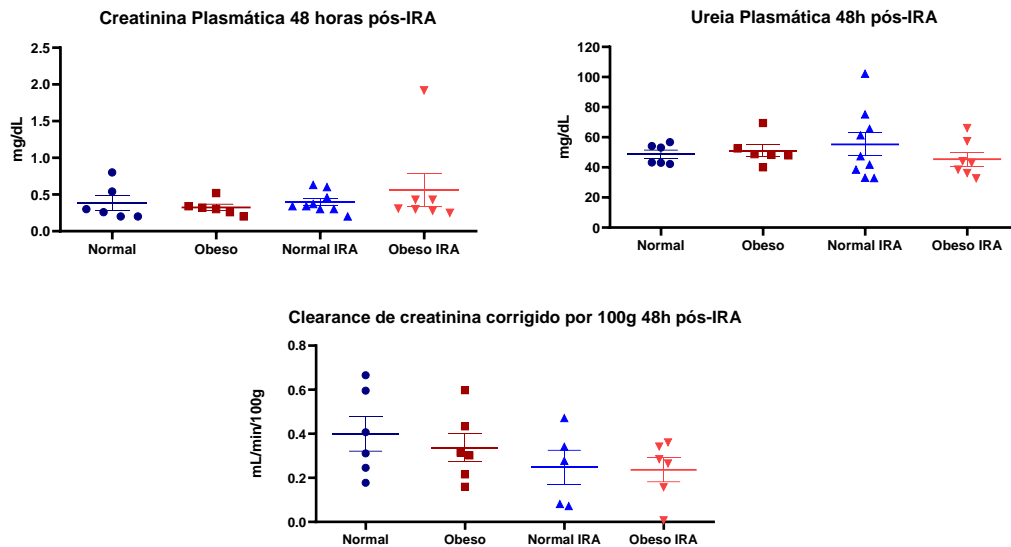


Figura 12:Concentração plasmática de creatinina e ureia e Clearance de creatinina corrigido por 100 g de peso pós 48h pós-IRA.

Entretanto, quando avaliamos a concentração urinária da Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica, NGAL, verificamos que os dois grupos submetidos à cirurgia de isquemia e reperfusão apresentavam concentrações significativamente mais altas de NGAL quando comparado aos seus pares controles. A concentração de NGAL urinário no grupo Obeso IRA também está mais elevado quando comparado ao grupo Normal IRA.

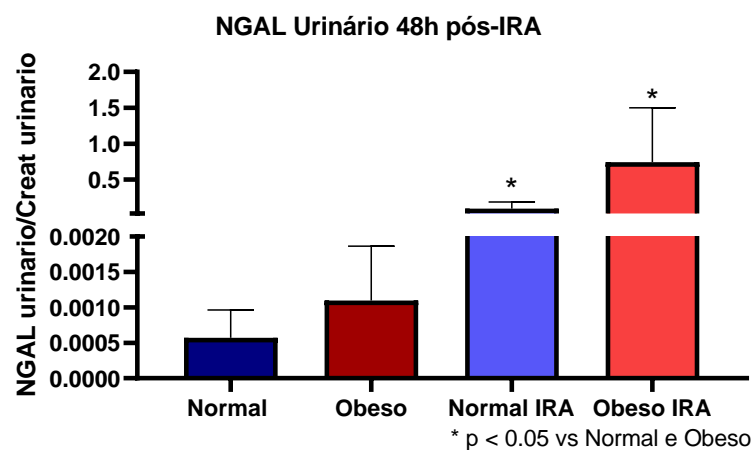


Figura 13: Concentração urinária de NGAL 48 horas pós-IRA.

Observamos diferença estatística significativa na Fração de Excreção (FE) de Na entre os grupos Normal e Obeso IRA. Já a FE de K se apresentava diminuída no grupo Obeso IRA em relação aos grupos Normal e Obeso. A FE de Ureia não foi diferente entre os grupos estudados.

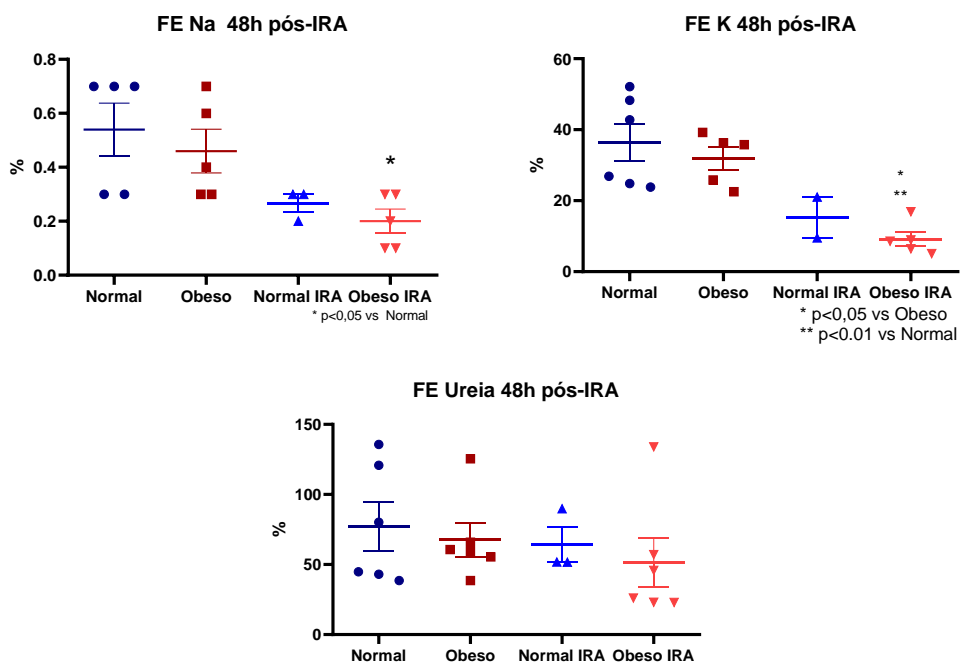


Figura 14: Fração de excreção de Na, K e Ureia 48 horas pós-IRA.

## Avaliação do Escore de lesão renal

O escore de lesão renal foi avaliado para cada camundongo, individualmente. Como esperado, os animais dos grupos Normal e Obeso não apresentaram nenhum grau de lesão renal, enquanto os grupos que sofreram IRA apresentaram lesão renal. A lesão renal no grupo Obeso IRA foi significativamente maior que nos grupos Normal e Obeso.

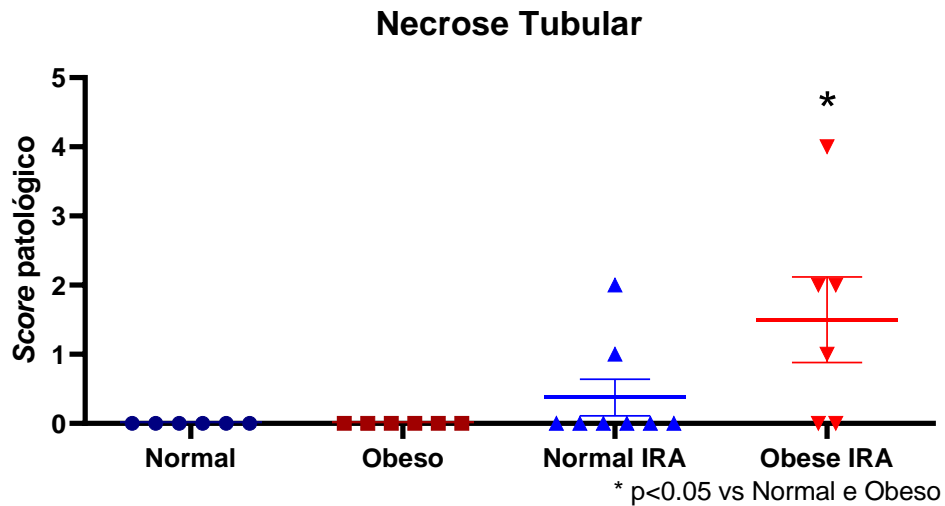


Figura 15: Escore de lesão renal 48 horas pós-IRA.



## Avaliação de marcadores inflamatórios

Avaliamos a infiltração de macrófagos no tecido renal 48 horas pós-IRA. Observamos que todos os grupos apresentaram aumento da infiltração de macrófagos em relação ao grupo Normal.

Quando avaliamos a expressão da proteína PCNA, observamos que esta está significativamente mais elevada no grupo Obeso IRA quando comparado aos outros grupos.

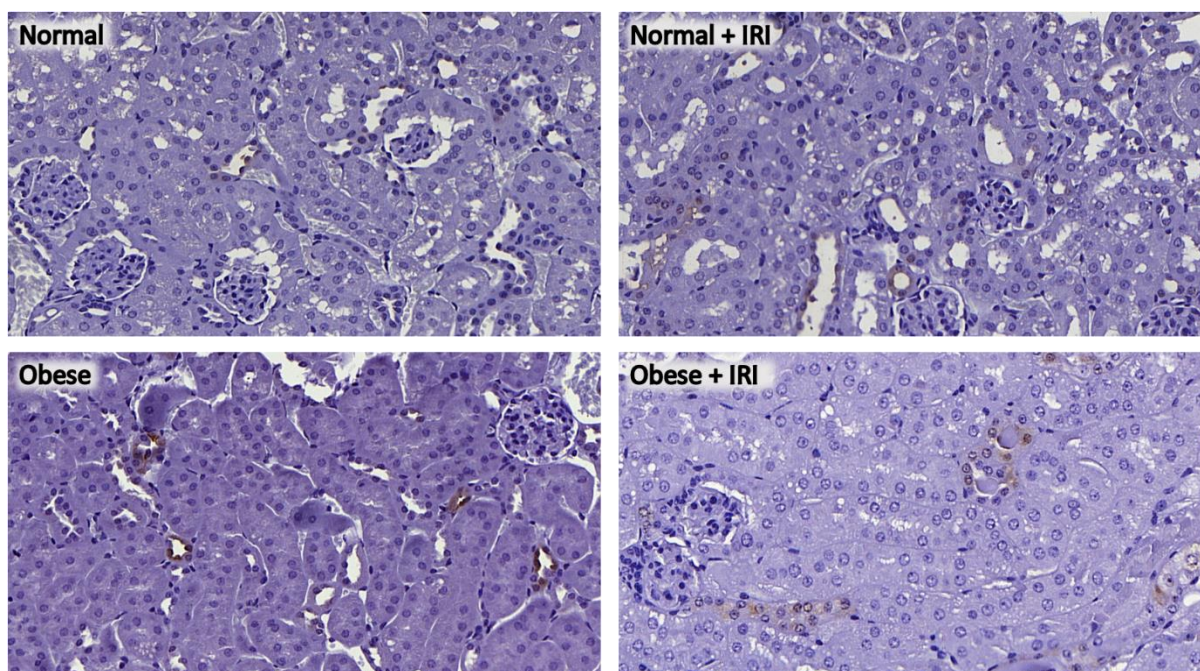
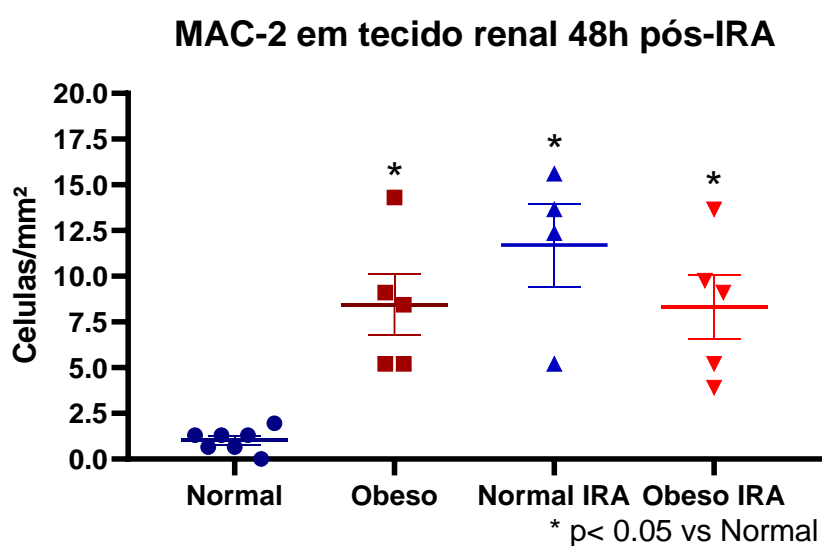


Figura 16: Infiltração de macrófagos em tecido renal 48 horas pós-IRA.



A expressão proteica de p65 estava significativamente aumentada no grupo Obeso IRA em relação ao grupo Obeso.

Curiosamente, não observamos diferença entre os grupos na expressão da proteína TLR4.

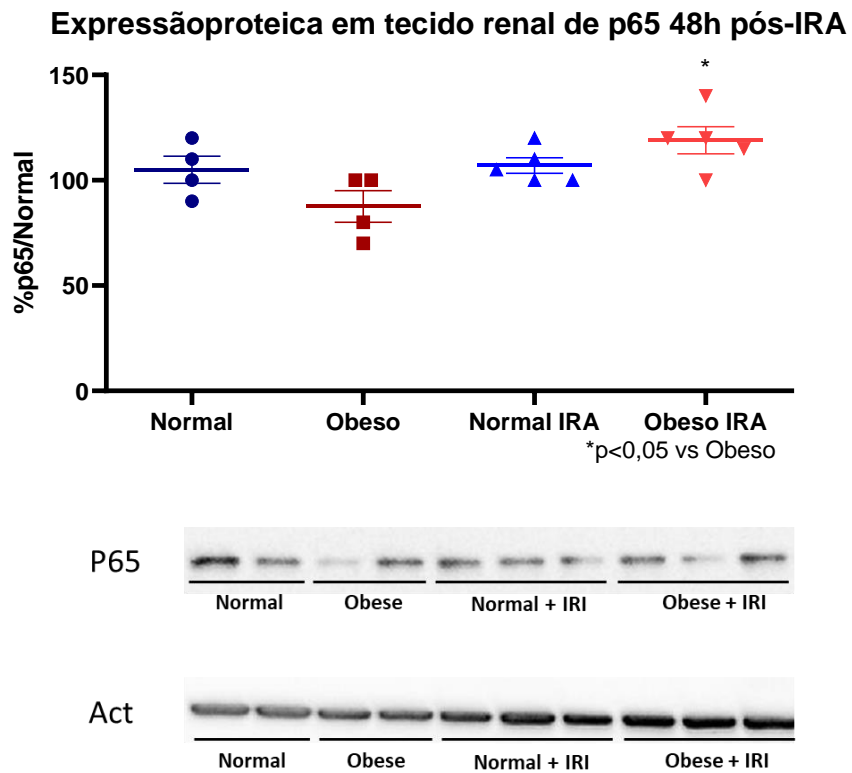
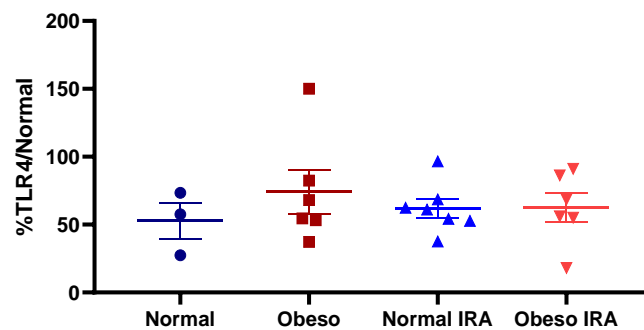


Figura 18: Expressão proteica de p65 em tecido renal 48 horas pós-IRA.

**Expressão proteica de TLR4 em tecido renal 48h pós-IRA**





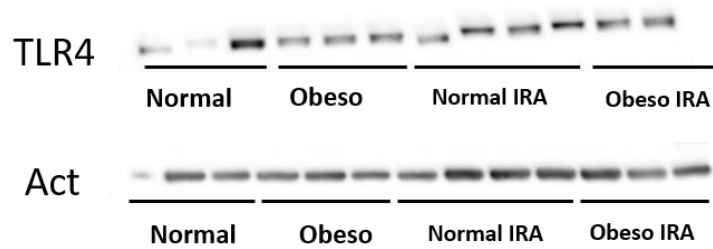


Figura 19: Expressão proteica de TLR4 em tecido renal 48 horas pós-IRA.

A expressão proteica de adiponectina não foi diferente entre os grupos apesar de tender a ser menos expressa nos grupos obesos.

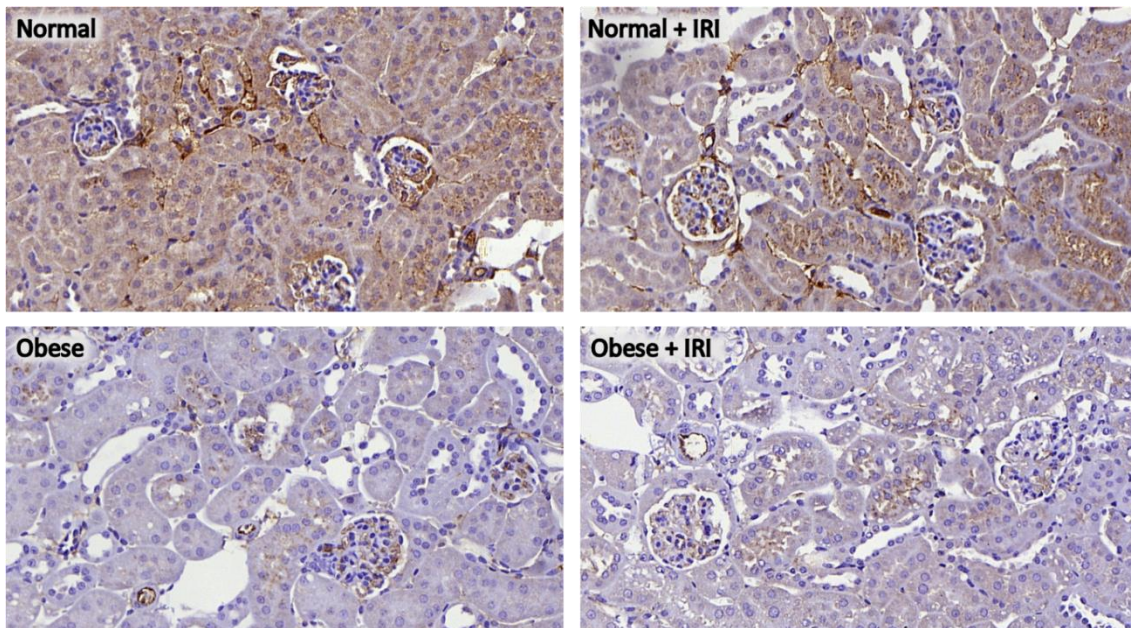
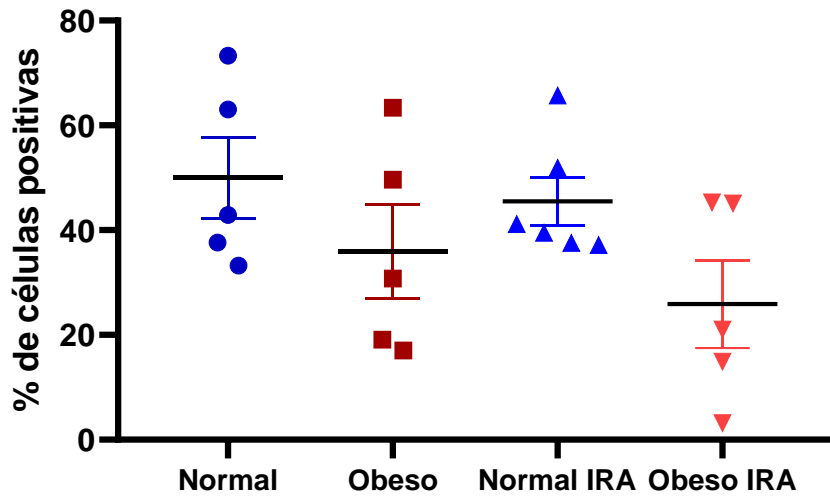


Figura 20: Expressão proteica de Adiponectina em tecido renal 48 horas pós-IRA.

## Avaliação de marcadores de estresse oxidativos

A concentração de TBARS urinário no grupo Obeso IRA foi significativamente maior que no grupo Normal. O grupo Obeso apresentou uma tendência ao aumento de TBARS.

Observamos que a expressão proteica de HO-1 estava significativamente aumentada nos grupos que sofreram IRA em relação aos grupos Normal e Obeso. Além disso, o grupo Obeso IRA apresentou também expressão significativamente maior de HO-1 em relação ao grupo Normal IRA.

Não observamos diferença em relação a expressão proteica de MNSOD.

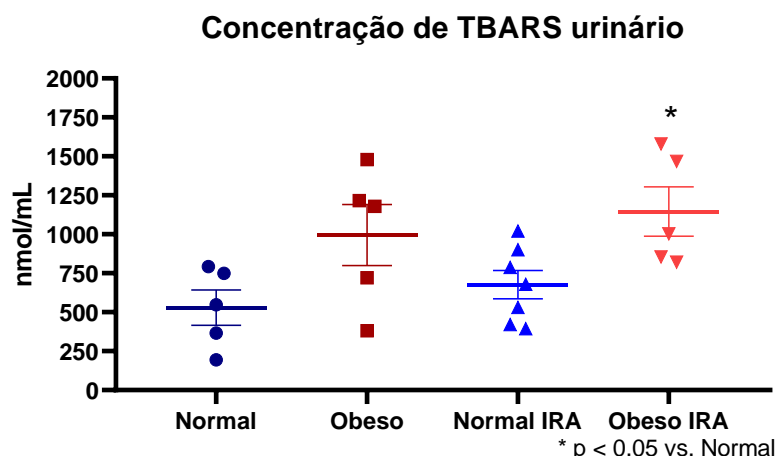
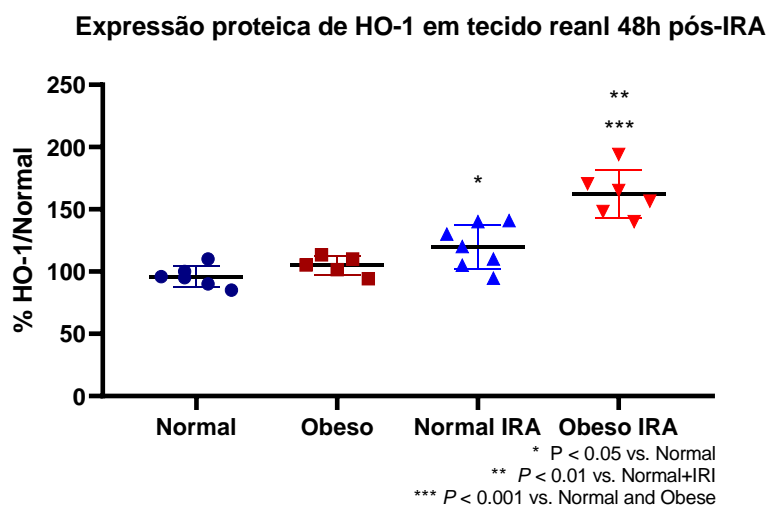


Figura 21: Concentração urinária de TBARS urinário.



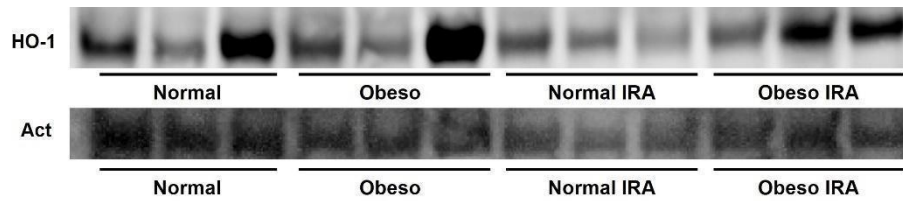


Figura 22: Expressão proteica de HO-1 em tecido renal 48 horas pós-IRA.

### Expressão proteica MNSOD em tecido renal 48h pós-IRA

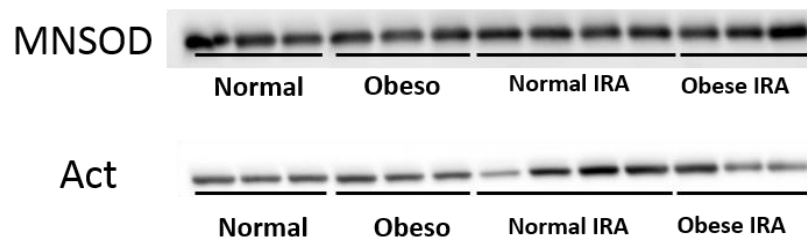
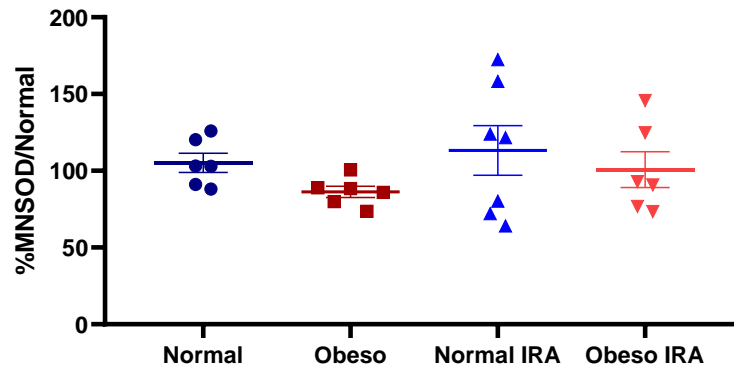


Figura 23: Expressão proteica de MNSOD em tecido renal 48 horas pós-IRA.

### Outros marcadores

A expressão de Caspase 3 foi estatisticamente maior nos grupos que sofreram IRA em relação aos grupos controles. Entretanto, o grupo Obeso IRA apresentou expressão ainda maior em relação ao grupo Normal IRA.

Além disso, observamos que os grupos que sofreram IRA apresentavam expressão de Klotho diminuída, apesar de encontrarmos significância estatística apenas entre o grupo Obeso IRA e Normal.

Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos em relação a expressão proteica de ACE1 e AT1.

### Expressão proteica de Caspase 3 em tecido renal 48h pós-IRA

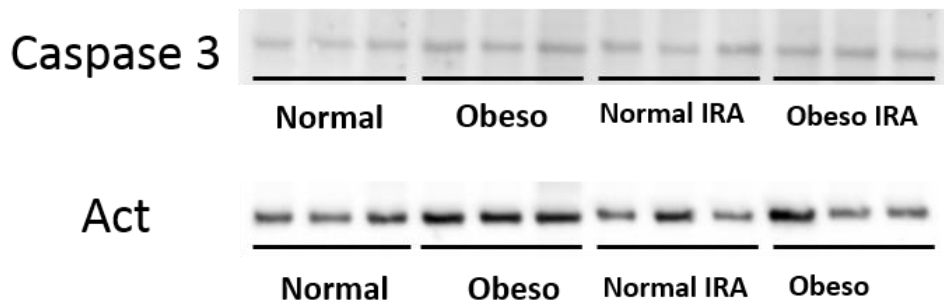
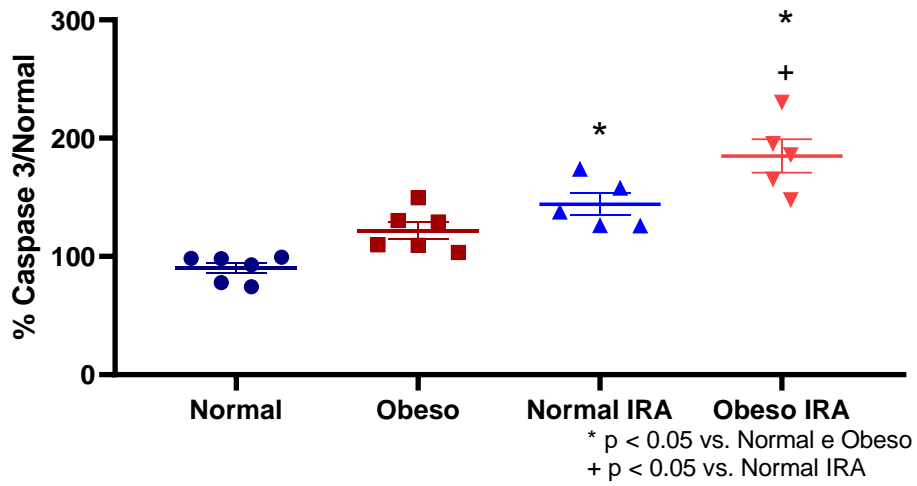


Figura 24: Expressão proteica de Caspase 3 em tecido renal 48 horas pós-IRA.

### Expressão proteica de Klotho 48h pós-IRA

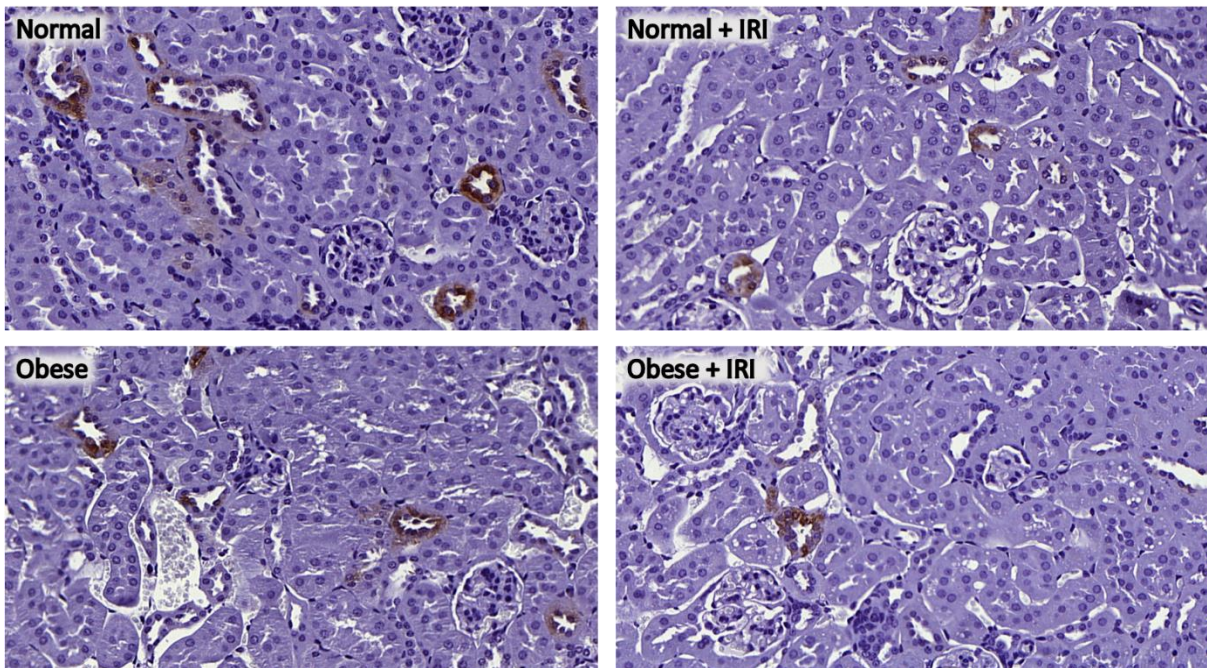
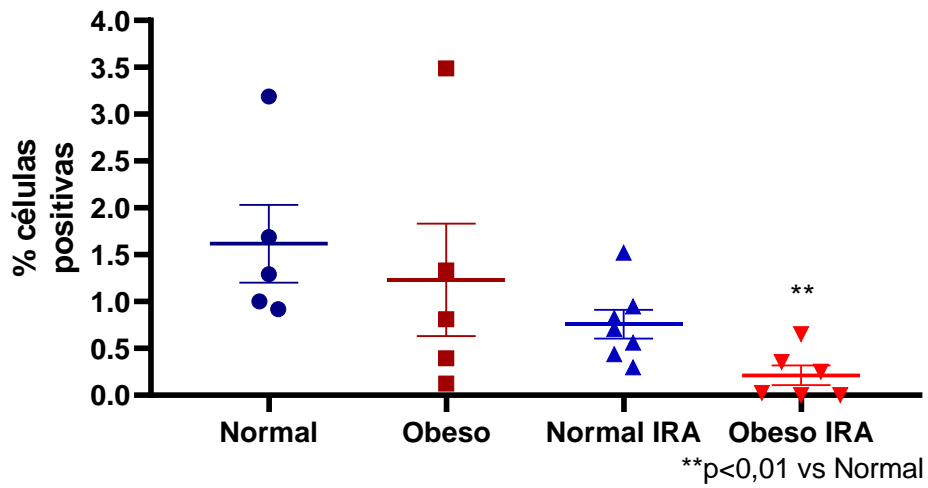


Figura 25: Expressão proteica de Klotho 48 horas pós-IRA.



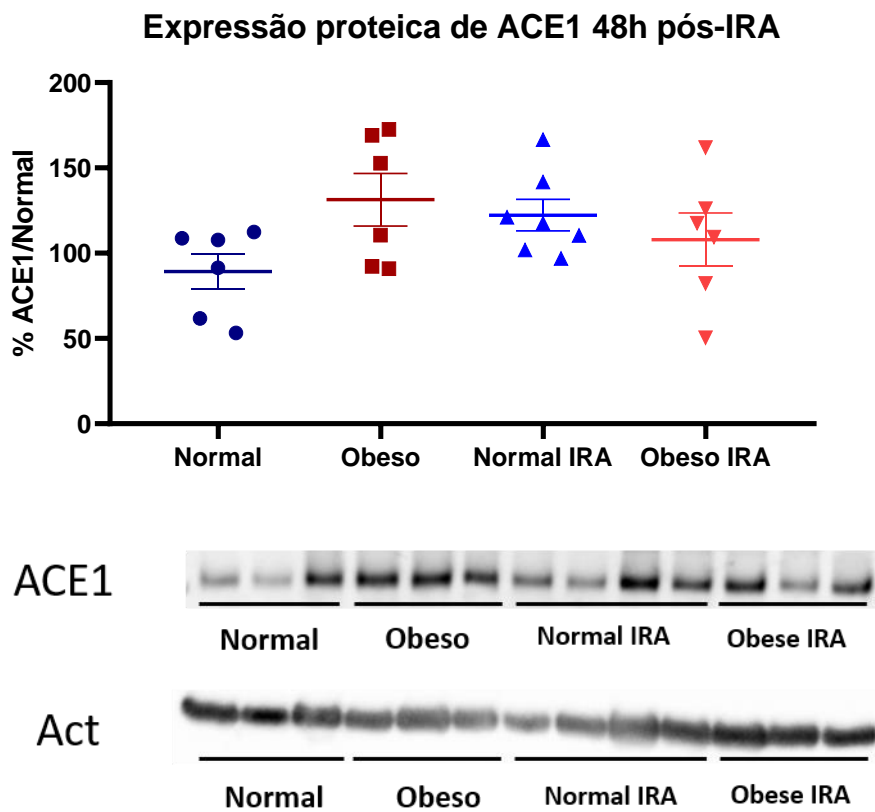


Figura 26: Expressão proteica de ACE1 48 horas pós-IRA..

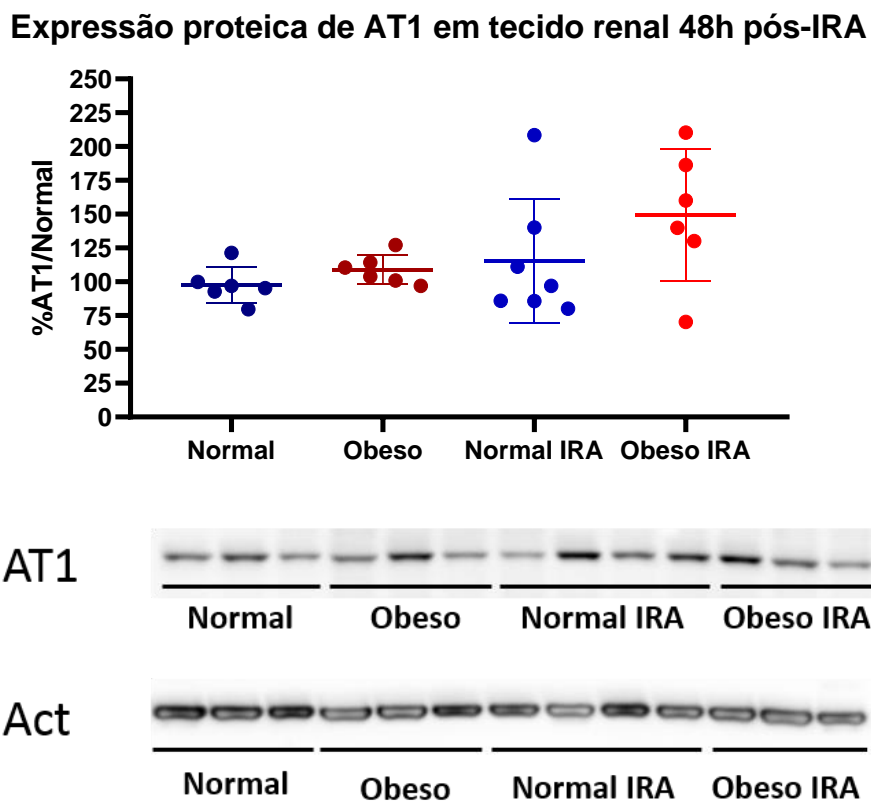


Figura 27: Expressão proteica de AT1 em tecido renal 48 horas pós-IRA.

## Discussão

A obesidade é reconhecida como uma epidemia global e como uma crise de saúde pública em vários países <sup>[30]</sup>, tendo também se mostrado um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença renal <sup>[31, 32]</sup>.

Neste trabalho conseguimos demonstrar que a obesidade aumentou a mortalidade em modelo de injúria renal aguda induzida por isquemia/reperfusão renal em camundongos.

Nosso modelo animal para estudo da obesidade apresentou resultados significativos de aumento de peso já com 4 semanas de dieta hiperlipídica, com cerca de 20% de aumento de peso corporal em relação aos animais alimentados com dieta normolipídica. Ao final de 8 semanas, a diferença de peso entre o grupo Obeso e Normal era ainda mais notável, cerca de 24% maior, demonstrando a eficiência do uso da linhagem de camundongos C57BL/6 em modelos de obesidade. <sup>[33]</sup>

Durante as 8 semanas de experimento, além do peso dos animais, não observamos diferenças significativas provocadas pela obesidade em outros parâmetros estudados. Observamos apenas diminuição na concentração de potássio urinário no grupo Obeso com 4 semanas de dieta hiper lipídica, essa diferença não foi mantida ao fim das 8 semanas de experimentos.

Após as oito semanas de dieta normo ou hiperlipídica 2/3 dos animais de cada grupo foram submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão renal. A mortalidade em 48 horas pós-IRA no grupo Obeso IRA foi de 41,7%, enquanto no grupo Normal IRA a mortalidade foi de 25%. Esse dado demonstra que a obesidade é um fator agravante da IRA. Apesar da significativa mortalidade nos grupos submetidos a IRA não observamos diferenças estatísticas em relação a creatinina e uréia plasmáticas. Da mesma forma, o clearance de creatinina não foi diferente entre os grupos. Porém, sabemos que a depuração da creatinina não é o melhor meio de estimar a taxa de filtração glomerular. Estudos mostram que a secreção tubular de creatinina é maior em pacientes obesos do que entre pacientes não obesos <sup>[34]</sup>. Até então não há estudos em animais mostrando que a obesidade agrava a IRA induzida por IRI.

Entretanto, pudemos observar que a concentração de NGAL estava elevada nos grupos submetidos a IRA. O NGAL é um marcador precoce de injúria tubular e

sabe-se que a gravidade da IRA está diretamente ligada ao grau de expressão do NGAL na urina, <sup>[35]</sup> o que reforça a possibilidade de que mesmo sem observarmos diferença estatística no clearance de creatinina, podemos concluir que os camundongos submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão desenvolveram IRA.

Além da maior expressão de NGAL urinário, os animais do grupo Obeso IRA apresentaram menor osmolalidade urinária, maior score de lesão renal e maior expressão de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e apoptose, além disso observamos menor expressão proteica da Klotho no tecido dos animais da grupo Obeso IRA. Todas essas alterações demonstram que a obesidade levou a danos renais. É interessante notar que não observamos diferenças em relação ao perfil lipídico nesses animais, nem em relação à glicemia, ou seja, nossos animais obesos não desenvolveram diabetes ou dislipidemia durante o período de alimentação com a dieta hiperlipídica. Pacientes obesos frequentemente também apresentam síndrome metabólica, diabetes, dislipidemia, hipertensão ou doença cardiovascular <sup>[36, 37]</sup>. Entretanto, a obesidade também tem se mostrado um fator de risco independente para o desenvolvimento de IRA, cujo risco foi correlacionado diretamente com o índice de massa corporal <sup>[38]</sup>. Portanto, podemos especular que a obesidade por si pode ser um fator agravante na IRA induzida por isquemia/reperfusão renal.

Demonstramos que camundongos do grupo Obesos já apresentam maior infiltração de macrófagos no tecido renal em relação aos camundongos do grupo Normal, mesmo sem serem submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão renal. Estes achados se mantêm nos grupos submetidos a IRA. Além disso observamos que os camundongos do grupo Obeso IRA apresentaram uma expressão aumentada de p65, sabidamente envolvido nas vias de inflamação tecidual. Estes achados corroboram a ideia de que a obesidade é um estado de inflamação crônica, o que acaba por agravar a IRA. <sup>[39]</sup> Os adipócitos armazenam o excesso de energia sofrendo hipertrofia. Os adipócitos viscerais sofrem hipertrofia ao armazenar lipídios adicionais, tornando-se pouco vascularizados e hipóxicos, o que resulta em aumento da produção de citocinas inflamatórias, infiltração de células imunes, bem como estresse celular e apoptose <sup>[40]</sup>. Quando isso ocorre, a gordura é armazenada nos rins, fígado, pâncreas, coração, músculo esquelético e outros tecidos, levando a uma

condição conhecida como lipotoxicidade. Como os macrófagos regulam o sistema imunológico inato, acabam desempenhando um papel crucial na inflamação do tecido adiposo. Tem sido demonstrado que a ativação e infiltração de macrófagos no tecido adiposo são mais pronunciados entre os pacientes obesos [40]. Os lipídios são um componente significativo no rim normal, representando aproximadamente 3% de seu peso úmido [41]. Confirmando nossos achados, Laurentius e outros [42] demonstraram que o número de monócitos/macrófagos infiltrados foi significativamente maior nos rins de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura do que naqueles de ratos alimentados com uma dieta controle. Em nosso trabalho, o anticorpo usado, MAC-2, marcou um fração dos macrófagos CSF1R+ e CX3CR1+, mas houve marcação inespecífica em células epiteliais tubulares [43], o que pode ter interferido na identificação da infiltração de macrófagos.

Ainda em relação ao estado de inflamação crônica observado na obesidade, demonstramos que camundongos do grupo Obeso apresentam menor expressão proteica de adiponectina, uma citocina produzida no tecido gorduroso e com função anti-inflamatória. Não observamos diferença significativa na expressão de adiponectina em tecido renal dos nossos grupos, mas é notável a tendência a menor expressão encontrada nos grupos de camundongos obesos. Os níveis séricos da proteína adiponectina são mais baixos em indivíduos obesos, principalmente naqueles com acúmulo de gordura visceral e metabolismo lipídico alterado, o que é paradoxal já que adiponectina é derivada de adipócitos [44]. Em modelo de IRI aguda em camundongos, Tsugawa- Shimizu et al. [45] detectaram adiponectina no endotélio das arteríolas renais e nos espaços peritubulares do córtex renal, bem como na medula renal interna e externa. Os autores demonstraram que havia mais dano tubular renal e maior permeabilidade vascular em camundongos nocaute para adiponectina do que em camundongos de tipo selvagem. Eles sugeriram que a adiponectina liga-se a T-caderina, desempenhando um papel na preservação da rede capilar e na atenuação da lesão tubular renal [45].

Além da inflamação, o estresse oxidativo está diretamente ligado a gravidade da IRA. Demonstramos que o grupo Obeso IRA apresentou maior expressão de marcadores de estresse oxidativo como o HO-1 e de TBARs. Em estudo anterior de outro grupo, ratos Zucker obesos desenvolveram lesão renal nas primeiras 24 h após

trauma ortopédico, embora o mesmo não ocorreu entre os ratos de peso normal [46]. Os pesquisadores demonstraram que os animais obesos que desenvolveram lesões renais apresentaram alteração de marcadores de estresse oxidativo como aumento de TBARs e aumento da atividade de NADPH oxidase [46].

Em nosso estudo pudemos demonstrar que a expressão da proteína Klotho estava significativamente diminuída em relação ao grupo Normal. Sabemos que a IRA por si só causa redução nos níveis da proteína Klotho, aumentando o processo de senescência dos tecidos renais [47]. Nossos resultados demonstraram que os animais do grupo Obeso já apresentam uma leve redução na expressão de Klotho, sendo que a redução é agravada quando os animais são submetidos a isquemia/reperfusão. A redução da expressão de Klotho leva ao aumento da apoptose, da fibrose e da senescência celular.[47] Animais com menor expressão de Klotho apresentam maior tendência a formação de fibrose tecidual e maior progressão da IRA para a DRC.[47] Estudos demonstraram que a proteína Klotho tem ação nefroprotetora, agindo contra o estresse oxidativo e protegendo o tecido renal na isquemia/perfusão.[48] Cui et al. [49] analisaram a associação entre o índice de adiposidade visceral e os níveis séricos da proteína Klotho. Os autores descobriram que, entre adultos dos Estados Unidos, houve uma associação não linear e uma relação dose-resposta, entre os níveis séricos de Klotho e o índice de adiposidade visceral. Eles mostraram que havia uma correlação negativa entre os dois fatores quando o índice de adiposidade visceral ficava abaixo de 3,21. Entre os indivíduos com índice de adiposidade visceral entre 0,29 e 3,21, os níveis de Klotho diminuíram à medida que a adiposidade visceral aumentou, e esses indivíduos eram mais propensos a síndromes relacionadas ao envelhecimento.[49] Portanto, podemos supor que a obesidade é um estado de deficiência de Klotho, que se torna muito mais acentuada quando animais obesos são submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão renal. Outros autores já demonstraram que a deficiência de Klotho aumentou a geração endógena de ROS, acentuando o estresse oxidativo tecidual [50, 51]. Em contrapartida, a superexpressão da proteína Klotho é protetora [52]. A suplementação com proteína Klotho demonstrou reduzir efetivamente o estresse oxidativo e preservou a função mitocondrial em camundongos [53].

## Conclusão

O aumento do estresse oxidativo pode ser um mecanismo que agrava a IRA induzida por cirurgia de isquemia/reperfusão renal em camundongos obesos. A proteína Klotho pode ser um alvo terapêutico importante para o tratamento da IRA.



## Apêndice

## Dados do primeiro período de gaiola metabólica:

### GRUPO NORMAL CONTROLE

Primeira Gaiola Metabólica											
Normal Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2N2 C	25,052	20,935	3	2,484	56,5	79,7	813	26,07	2622,1	9,13	1,79
G2N1 C	23,846	19,867	2	0,951	44,4	72,8	1025	31,11	3201,9	13,18	2,92
G3N1 C	17,894	13,812	2	1,333	98	88,6	1088	21,92	2971,5	18,95	4,65
G4N1 C	20	19	5	0,35	62,6	274,2	1876	29,9	3452,8	0,0	0,0
G5N1 C	20	17	4	1	83,3	169,9	1366	29,1	3452,8	26,4	11,6
G6N1 C	23,86	19,62	6	3	42,1	66,3	898	23	1617,6	11,0	2,8
<b>Média</b>	<b>21,775</b>	<b>18,372</b>	<b>3,667</b>	<b>1,520</b>	<b>64,483</b>	<b>125,2</b> <b>50</b>	<b>1177,6</b> <b>67</b>	<b>26,850</b>	<b>2886,450</b>	<b>13,110</b>	<b>3,960</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

### GRUPO OBESO CONTROLE

Primeira Gaiola Metabólica											
Obeso Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G1H6 C	23,472	20,114	4	0,8	45	65,9	1133	38,07	3032,9	15,31	4,02
G2H6 C	22,717	18,625	2	0,531	8,9	150,8	1831	52,14	3755,4	24,81	6,06
G3H6 C	19,026	15,086	2	0,112				66,51	3755,4		
G4H7 C	19	20	5	0,15	84,7	407	3736	10,4	2580,1	0,0	0,0
G5H6 C	21	18	3	0,4	129,7	200,6	2204	36,5	3452,8	0,0	0,0
G6H6 C	25,368	21,396	3	1,6	77,3	87	618	23,7	2200,2	11,1	4,7
<b>Média</b>	<b>21,764</b>	<b>18,870</b>	<b>3,167</b>	<b>0,599</b>	<b>69,12</b> <b>0</b>	<b>182,26</b> <b>0</b>	<b>1904,4</b> <b>00</b>	<b>37,887</b>	<b>3129,46</b> <b>7</b>	<b>10,244</b>	<b>2,956</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

### GRUPO NORMAL IRA

Primeira Gaiola Metabólica											
Normal IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	MgU	Ca U
G1N1 IRA	23,221	20,645	4	2,4	53	64	834	25,9	3009,1	8,9	2,01
G2N3 IRA	28,528	23,739	1	2,476	65,7	113,8	1554	37,77	3755,4	22,4	2,97
G2N4 IRA	24,198	20,57	3	1,684	70,9	91,5	1114	28,29	3483,7	4,09	3,16
G2N5 IRA	23,013	19,539	3	0,83	52,7	115,5	1636	50,22	3225,7	20	4,91
G3N2 IRA	21,615	18,006	3	0,68	118	95,1	1065	24,44	2669,7	0,45	4,26
G3N3 IRA	23,876	19,955	2	0,696	70,1	96,8	1198	35,4	3596,4	8,5	4,16
G4N2 IRA	18	18	4	0,05				39,9	3452,8	0,0	0,0
G4N3 IRA	20	20	6	0,3	76,1	356,5	2504	31,7	3452,8	0,0	0,0
G5N2 IRA	19	16	3	0,35	167,7	306,3	2910	40,3	3452,8	0,0	0,0

G5N3 IRA	21	18	3	0,65	78,6	157,4	1030	21,9	2361,3	22,9	7,4
G6N2 IRA	25,504	20,18	6	4	56,9	48,2	428	14,9	1381,6	8,1	3,0
G6N3 IRA	25,928	20,423	4	1,8	67,2	81,1	553	23,5	2249,7	8,4	3,6
<b>Média</b>	<b>22,824</b>	<b>19,588</b>	<b>3,500</b>	<b>1,326</b>	<b>79,718</b>	<b>138,74</b> <b>5</b>	<b>1347,818</b>	<b>31,185</b>	<b>3007,58</b> <b>3</b>	<b>8,645</b>	<b>2,956</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## GRUPO OBESO IRA

Primeira Gaiola Metabólica											
Obeso IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2H7 IRA	23,863	19,958	6	3,851	34	45,8	452	16	1705,5	6,81	13,85
G2H8 IRA	22,639	18,57	2	0,642	84,5	102,5	1056	28,88	3320,9	7,54	2,99
G2H9 IRA	24,869	20,336	4	2,333	55,4	75,9	703	20,44	2597,1	3,4	3,7
G2H10 IRA	22,462	19,192	3	1,343	69,7	64	848	21,18	2183,8	4,6	1,9
G3H7 IRA	22,38	17,652	3	0,383	43,1	50,5	1210	26,81	3335,9	5,63	2,97
G3H8 IRA	24,361	20,203	2	0,873	71,1	107,9	2025	44	3755,4	8,45	3,34
G4H8 IRA	21	20	5	0							
G4H9 IRA	22	21	5	1	46,1	357,1	2413	35,2	3452,8	27,4	14,3
G5H7 IRA	20	17	2	0,65	152,1	224,8	1948	38,5	3452,8	26,9	12,5
G5H8 IRA	21	17	4	0,42	138	230,5	1604	27,5	3452,8	25,0	9,3
G6H7 IRA	24,464	19,054	3	1,2	92,2	134,2	1483	36,7	3232,9	12,9	5,8
G6H8 IRA	23,011	18,028	6	2,7	60,8	63,3	544	17,6	1828,3	7,4	2,5
<b>Média</b>	<b>22,671</b>	<b>18,999</b>	<b>3,750</b>	<b>1,283</b>	<b>77,000</b>	<b>132,4</b> <b>09</b>	<b>1298,72</b> <b>7</b>	<b>28,437</b>	<b>2938,01</b> <b>8</b>	<b>12,366</b>	<b>6,650</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## Dados do segundo período de gaiola metabólica:

### GRUPO NORMAL CONTROLE

Segunda Gaiola Metabólica											
Normal Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2N2 C	28,14	27,22	4,0	1,60	101,90	183,90	2144,00	42,18	3625,73	9,70	6,31
G2N1 C	26,32	26,37	4,0	1,10	63,70	112,70	1442,00	30,55	3625,73	11,44	8,93
G3N1 C	20,86	20,45	3,5	1,40	58,40	83,10	1590,00	35,93	3625,73	12,18	4,23
G4N1 C	24,529	24,786	4	0,7	152,3	313,3	3402	50,2	0,0	20,3	11,3
G5N1 C	26,507	27,728	3	0,8	174,4	289,8	3219	51,1	0,0	9,2	7,6
G6N1 C	27,789	27,55	4	1,00	152,7	220,5	2600	42,94	6934,82	7,49	24,45
<b>Média</b>	<b>25,110</b>	<b>24,681</b>	<b>3,833</b>	<b>1,367</b>	<b>74,667</b>	<b>126,5</b> <b>67</b>	<b>1725,3</b> <b>33</b>	<b>36,220</b>	<b>3625,730</b>	<b>11,107</b>	<b>6,490</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## GRUPO OBESO CONTROLE

Segunda Gaiola Metabólica											
Obeso Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G1H6 C	23,472	20,114	4,0	0,8	33,2	85,6	1231	47,71	1346,8	11,71	4,06
G2H6 C	22,717	18,625	2,0	0,531	24	37,2	580	20,65	3625,73	7,55	2,75
G3H6 C	19,26	15,086	2,0	0,112	66,3	114,1	1701	34,47	3625,73	7,42	6,42
G4H7 C	27,178	26,249	3	0,9	83,2	151	2096	45,3	5526,8	20,3	10,6
G5H6 C	31,072	32,377	5	0,94	117,8	171,4	2469	40,9	6016,3	16,7	12,1
G6H6 C	35,556	35,07	5,7	1	107,1	178,2	2796	42,91	7128,35	9,26	15,36
<b>Média</b>	<b>21,816</b>	<b>17,942</b>	<b>2,667</b>	<b>0,481</b>	<b>41,16</b>	<b>78,967</b>	<b>1170,6</b>	<b>34,277</b>	<b>2866,08</b>	<b>8,893</b>	<b>4,410</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## GRUPO NORMAL IRA

Segunda Gaiola Metabólica											
Normal IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	MgU	Ca U
G1N1 IRA	26,054	22,074	4,0	2,8	27,8	33,4	420	14,69	1416,93	6,54	2,03
G2N3 IRA	30,254	29,612	5,0	1,7	81,1	131,6	1515	36,95	3625,73	7,92	5,7
G2N4 IRA	26,317	26,981	5,0	1,4	81,9	166	2202	36,8	3625,73	11,17	8,04
G2N5 IRA	24,445	34,385	4,0	1,4	66,5	133,2	1842	27,35	3625,73	8,62	6,58
G3N2 IRA	25,96	25,88	4,0	0,9	103,1	155,6	2502	53,24	3625,73	8,09	16,64
G3N3 IRA	30,203	28,9	3,0	0,7	89,3	136	1434	39,85	3625,73	12,72	7,54
G4N2 IRA	25,327	25,029	3	0,5	171,5	275,3	3160	52,4	6675,2	23,4	17,2
G4N3 IRA	23,031	22,592	3	0,7	121,9	238,6	2779	51,3	0,0	16,1	7,8
G5N2 IRA	24,481	24,854	3	0,3	167,3	292,4	3802	66,4	0,0	23,8	13,5
G5N3 IRA	23,128	23,64	3	0,3	114,3	250,3	3261	50,5	0,0	12,1	6,5
G6N2 IRA	28,687	28,61	7,3	2	90	95,3	1157	21,70	3914,77	9,10	14,28
G6N3 IRA	28,221	37,82	3,5	1	75,08	107	2099	38,91	5830,56	6,47	18,96
<b>Média</b>	<b>27,206</b>	<b>27,972</b>	<b>4,167</b>	<b>1,483</b>	<b>74,950</b>	<b>125,96</b>	<b>1652,500</b>	<b>34,813</b>	<b>3257,59</b>	<b>9,177</b>	<b>7,755</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## GRUPO OBESO IRA

Segunda Gaiola Metabólica											
Obeso IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2H7 IRA	31,468	30,731	4,0	1,6	45,9	66,3	1609	30,69	3625,73	6,28	3,99
G2H8 IRA	29,622	28,186	4,0	1,3	86,1	182,6	1978	33,6	3625,73	7,65	5,2
G2H9 IRA	34,081	32,846	4,5	2,5	49,7	85,2	1281	23,71	3625,73	7,62	4,36
G2H10 IRA	29,666	29,446	4,0	1,2	57,5	85,8	1943	34,91	3625,73	12,55	6,57

G3H7 IRA	32,296	31,47	4,0	1,5	67,1	123,7	1738	35,64	3625,73	7,95	8,67
G3H8 IRA	33,767	32,62	4,0	1,1	74,8	138,8	2068	40,58	3625,73	10,44	10,46
G4H8 IRA	34,534	31,643	2	0,5	84,4	174,3	2168	54,4	5586,3	21,4	14,8
G4H9 IRA	28,368	27,126	0	0							
G5H7 IRA	32,697	31,846	3	0,52	142,4	160,9	2089	47,6	6025,5	22,5	8,6
G5H8 IRA	31,341	31,34	3	0,62	159,2	230,4	2919	37,2	0,0	16,4	10,5
G6H7 IRA	34,586	34,11	7,8	1,5	81,1	125,1	1884	34,96	6481,83	5,16	13,37
G6H8 IRA	31,035	29,45	4,9	1,8	40	44,8	879	19,68	2804,75	3,70	9,00
<b>Média</b>	<b>31,955</b>	<b>30,901</b>	<b>3,767</b>	<b>1,178</b>	<b>80,745</b>	<b>128,900</b>	<b>1868,727</b>	<b>35,725</b>	<b>3877,524</b>	<b>11,059</b>	<b>8,684</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

### Dados do terceiro período de gaiola metabólica: GRUPO NORMAL CONTROLE

Terceira Gaiola Metabólica											
Normal Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2N2 C	30,091	26,328	4	2,2	43	71,2	758	33,98	2436,48	10,11	7,51
G2N1 C	30,274	26,769	6	2	33,8	54,8	506	18,49	1781,92	1,15	4,2
G3N1 C	22,904	22,214	4	1,4	57,5	117,1	1317	35,41	3244,67	12,76	7,46
G4N1 C	26,248	25,953	1,5	0,4	133,5	315,5		76,05	7936,84	16,25	13,60
G5N1 C	29,419	30,541	4	0,9	148,9	289,2	4016	65,07	7936,86	7,26	1,86
G6N1 C	31,739	31,417	3,5	1,3	103,2	173,7	1749	32,50	3762,20	16,30	8,70
<b>Média</b>	<b>28,446</b>	<b>27,204</b>	<b>3,833</b>	<b>1,367</b>	<b>86,650</b>	<b>170,250</b>	<b>1669,200</b>	<b>43,583</b>	<b>4516,495</b>	<b>10,638</b>	<b>7,222</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

### GRUPO OBESO CONTROLE

Terceira Gaiola Metabólica											
Obeso Controle	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G1H6 C	32,488	31,027	3,5	0,8	87,7	160,9	2334	45,73	3244,67	19,75	12,99
G2H6 C	34,792	34,581	7	1,8	62,4	140,8	2177	38,42	3244,67	12,4	9,47
G3H6 C	29,297	29,466	2	0,9	83,2	157,1	2441	53,05	3244,67	9,64	7,78
G4H7 C	29,178	29,146	4	1,3	121,6	168,2	2622	38,59	7936,84	8,51	19,18
G5H6 C	37,036	36,578	4	0,7	127,1	185,1	3239	40,98	7936,86	8,98	13,55
G6H6 C	39,884	39,223	3	1,1	146,4	201,9	3077	46,50	3762,20	21,80	17,00
<b>Média</b>	<b>33,779</b>	<b>33,337</b>	<b>3,917</b>	<b>1,100</b>	<b>104,733</b>	<b>169,000</b>	<b>2648,333</b>	<b>43,878</b>	<b>4894,985</b>	<b>13,513</b>	<b>13,328</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

### GRUPO NORMAL IRA

Terceira Gaiola Metabólica											
----------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Normal IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	MgU	Ca U
G1N1 IRA	25,78	25,158	3	0,9	77,3	71,5	1560	70,11	3244,67	17,31	11,45
G2N3 IRA	29,019	27,671	1	0							
G2N4 IRA	24,089	24,622	4	0,6	56,6	112	1850	74,98	3244,67	14,55	8,56
G2N5 IRA	29,764	29,804	3	0,3			1043	62,08	3041,27		
G3N2 IRA	24,089	24,622	4	0,6	56,6	112	1850	74,98	3244,67	14,55	8,56
G3N3 IRA	29,764	29,804	3	0,3			1043	62,08	3041,27		
G4N2 IRA	24,139	22,487	1,5	0,1	24,6	82	1526	73,52			
G4N3 IRA											
G5N2 IRA	23,786	23,598	3	0,1			1805				
G5N3 IRA	22,979	22,848	4	0,1			3238	90,84			
G6N2 IRA	29,928	29,484	3,5								
G6N3 IRA	27,598	26,91	3								
<b>Média</b>	<b>26,449</b>	<b>26,092</b>	<b>3,000</b>	<b>0,333</b>	<b>53,775</b>	<b>94,375</b>	<b>1739,375</b>	<b>72,656</b>	<b>3163,309</b>	<b>15,471</b>	<b>9,522</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## GRUPO OBESO IRA

Terceira Gaiola Metabólica											
Obeso IRA	Peso Pré	Peso Pós	Água ingerida	Vol. Urina	NaU	KU	Osm U	Creat U	Ureia U	Mg U	Ca U
G2H7 IRA	33,836	32,217	3,5	0,1			1305	75,27	3015,3		
G2H8 IRA	32,482	31,761	4	0,9	47,3	48,5	1463	74,7	3244,67	10,29	5,55
G2H9 IRA	34,718	33,866	5	1,8	20,6	24	625	42,01	1975,58	5,52	3,62
G2H10 IRA											
G3H7 IRA											
G3H8 IRA	34,986										
G4H8 IRA	35,247	33,896	2	0							
G4H9 IRA	28,78	28,346	5	1	59,8	73,2	820	32,53	1763,10	3,98	5,47
G5H7 IRA											
G5H8 IRA	32,006	31,056	4	0,4	77	52	1205	54,64	1967,67	7,12	5,97
G6H7 IRA	35,163	33,097	3	0,3	32,3	91,3	2521	126,90	3762,20	20,20	3,90
G6H8 IRA											
<b>Média</b>	<b>33,402</b>	<b>32,034</b>	<b>3,786</b>	<b>0,643</b>	<b>47,400</b>	<b>57,800</b>	<b>1323,167</b>	<b>67,675</b>	<b>2621,420</b>	<b>9,422</b>	<b>4,902</b>

Peso (g); Água ingerida (mL); Vol. U: volume de urina (mL); NaU: concentração de sódio urinário (mEq/L); KU: concentração de potássio urinário (mEq/L); OsmU: Osmolalidade urinária (mOsm/kg); Creat U: concentração de creatinina urinária (mg/dL); Ureia U: concentração de uréia urinária (mg/dL); MgU: concentração de magnésio urinário (mg/dL); CaU: concentração de cálcio urinário (mg/dL).

## Dados de dosagem sanguínea

### GRUPO NORMAL CONTROLE

Leitura Sangue										
Normal Controle	Na P	K P	Osm P	Creat. P	Ureia P	Mg P	Ca P	Colesterol P	Triglicérides	Glicose

G2N2 C	146,4	3,22	278	0,8	42,26	1,16	8,15	162,32	298,05	283,94
G2N1 C	148,1	3,74	297	0,54	43,07	1,28	9,19	80,33	179,76	263,09
G3N1 C	148,9	3,61	328	0,26	53,17	1,33	10,13	115,78	150,19	182,25
G4N1 C		3,35	319	0,20	54,12	1,87	7,29	268,24	134,7	275,69
G5N1 C	138,3	3,3	313	0,20	56,76	1,69	7,73	191,46	28,6	378,47
G6N1 C	139,6	3,32	319	0,30	43,30	1,80	4,80	158,4	266,8	51,7
<b>Média</b>	<b>144,26</b> <b>0</b>	<b>3,423</b>	<b>309,000</b>	<b>0,383</b>	<b>48,780</b>	<b>1,522</b>	<b>7,882</b>	<b>162,8</b>	<b>176,4</b>	<b>239,2</b>

NaP: concentração de sódio plasmático (mEq/L); KP: concentração de potássio plasmático (mEq/L); Osm P: osmolalidade plasmática (mOsm/kg); Creat. P: concentração de creatinina plasmática (mg/dL); Ureia P: concentração de uréia plasmática (mg/dL); Mg P: concentração de magnésio plasmático (mg/dL); Ca P: concentração de cálcio plasmático (mg/dL); Colesterol P: concentração de colesterol plasmático (mg/dL); Triglicérides: concentração de triglicérides plasmáticos (mg/dL); Glicose: concentração de glicose plasmática (mg/dL).

## GRUPO OBESO CONTROLE

Leitura Sangue										
Obeso Controle	Na P	K P	Osm P	Creat. P	Ureia P	Mg P	Ca P	Colesterol P	Triglicérides	Glicose
G1H6 C	144,8	3,55	311	0,26	47,94	1,21	8,65	131,3	139,29	463,09
G2H6 C	150,7	3,28	316	0,32	48,76	0,76	9,52	150,13	252,91	316,61
G3H6 C	143,9	3,93	314	0,52	48,29	0,89	10,18	98,61	239,68	443,38
G4H7 C	141,4	3,87	325	0,20	69,47	2,16	5,25	219,9	46,25	135,06
G5H6 C			324	0,34	52,53	2,72	9,70	267,29	16,3	394,44
G6H6 C	140	3,59	325	0,30	40,00	2,00	8,00	130,5	392,6	48,6
<b>Média</b>	<b>144,16</b> <b>0</b>	<b>3,644</b>	<b>319,167</b>	<b>0,323</b>	<b>51,165</b>	<b>1,623</b>	<b>8,550</b>	<b>166,3</b>	<b>181,2</b>	<b>300,2</b>

NaP: concentração de sódio plasmático (mEq/L); KP: concentração de potássio plasmático (mEq/L); Osm P: osmolalidade plasmática (mOsm/kg); Creat. P: concentração de creatinina plasmática (mg/dL); Ureia P: concentração de uréia plasmática (mg/dL); Mg P: concentração de magnésio plasmático (mg/dL); Ca P: concentração de cálcio plasmático (mg/dL); Colesterol P: concentração de colesterol plasmático (mg/dL); Triglicérides: concentração de triglicérides plasmáticos (mg/dL); Glicose: concentração de glicose plasmática (mg/dL).

## GRUPO NORMAL IRA

Leitura Sangue										
Normal IRA	Na P	K P	Osm P	Creat. P	Ureia P	Mg P	Ca P	Colesterol P	Triglicérides	Glicose
G1N1 IRA	150,3	3,96	317	0,37	33,08	1,48	9,29	113,57	185,21	126,19
G2N3 IRA	153,1	5,57	332	0,63	102,16	1,82	10,23	195,01	196,1	204,22
G2N4 IRA	148,7	3,26	316	0,46	38,42	1,32	9	150,69	96,49	205,63
G2N5 IRA	149	3,62	311	0,6	32,85	1,37	9,46	163,98	94,94	382,53
G3N2 IRA	148,7	3,26	316	0,46	38,42	1,32	9,00	150,69	96,49	205,63
G3N3 IRA	149	3,62	311	0,60	32,85	1,37	9,46	163,98	94,94	382,53
G4N2 IRA			336	0,20	75,12	2,29	7,50	286,25	59,86	179,5
G4N3 IRA										
G5N2 IRA	143,8	3,4	308	0,34	47,37	1,75	7,91	240,75	21,76	242,36
G5N3 IRA	144,5	3,23	318	0,34	61,26	1,50	7,31	234,12	103,4	225,69
G6N2 IRA	140,5	3,26	311	0,30	65,60	2,20	5,70	159,9	221,7	47,1
G6N3 IRA	143,8	3,43	329	0,30	41,80	1,90	8,40	167	123,1	3,1

Média	147,14 0	3,661	318,636	0,418	51,722	1,666	8,478	190,1	122,5	179,6
-------	-------------	-------	---------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-------

NaP: concentração de sódio plasmático (mEq/L); KP: concentração de potássio plasmático (mEq/L); Osm P: osmolalidade plasmática (mOsm/kg); Creat. P: concentração de creatinina plasmática (mg/dL); Ureia P: concentração de uréia plasmática (mg/dL); Mg P: concentração de magnésio plasmático (mg/dL); Ca P: concentração de cálcio plasmático (mg/dL); Colesterol P: concentração de colesterol plasmático (mg/dL); Triglicérides: concentração de triglicérides plasmáticos (mg/dL); Glicose: concentração de glicose plasmática (mg/dL).

## GRUPO OBESO IRA

Leitura Sangue										
Obeso IRA	Na P	K P	Osm P	Creat. P	Ureia P	Mg P	Ca P	Colesterol P	Triglicérides	Glicose
G2H7 IRA	156,6	5,82	377	1,92	57,46	2,16	9,58	136,84	171,2	170,7
G2H8 IRA	149,9	3,23	313	0,43	32,74	1,26	10,85	119,66	171,98	246,76
G2H9 IRA	150	3,81	321	0,43	44,11	1,37	9,57	189,47	287,93	224,78
G2H10 IRA										
G3H7 IRA										
G3H8 IRA										
G4H8 IRA	145,4	2,85	318	0,25	36,25	1,91	8,66	231,27	49	232,98
G4H9 IRA	151,9	3,73	320	0,28	66,16	2,18	70,90	245,49	117	153,81
G5H7 IRA										
G5H8 IRA	147,9	3,3	314	0,31	43,00	2,22	8,62	270,14		221,18
G6H7 IRA	142,7	4,27	328	0,30	38,50	2,00	10,40	180,6	215,7	41,7
G6H8 IRA										
Média	149,20 0	3,859	327,286	0,560	45,460	1,871	18,369	196,2	168,8	184,6

NaP: concentração de sódio plasmático (mEq/L); KP: concentração de potássio plasmático (mEq/L); Osm P: osmolalidade plasmática (mOsm/kg); Creat. P: concentração de creatinina plasmática (mg/dL); Ureia P: concentração de uréia plasmática (mg/dL); Mg P: concentração de magnésio plasmático (mg/dL); Ca P: concentração de cálcio plasmático (mg/dL); Colesterol P: concentração de colesterol plasmático (mg/dL); Triglicérides: concentração de triglicérides plasmáticos (mg/dL); Glicose: concentração de glicose plasmática (mg/dL).



## Referências

1. Section 2: AKI Definition. *Kidney International Supplements* 2.1 (2012): 19–36.
2. Ostermann, M., & Liu, K. (2017). Pathophysiology of AKI. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 31(3), 305–314.
3. Martin C, Eon B, Saux P, et al. Renal effects of norepinephrine used to treat septic shock patients. *Crit Care Med* 1990;18: 282e5
4. Poukkanen M, Wilkman E, Vaara ST, et al. Hemodynamic variables and progression of acute kidney injury in critically ill patients with severe sepsis: data from the prospective observational FINNAKI study. *Crit Care* 2013;17:R295.
5. Walsh M, Deveraux PJ, Garg AX, et al. Relationship between intraoperative mean arterial pressure and clinical outcomes after noncardiac surgery: toward an empirical definition of hypotension. *Anesthesiology* 2013;119(3):507e15.
6. Prowle J, Bagshaw SM, Bellomo R. Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm? *Curr Opin Crit Care* 2012;18(6):585e92.
7. Ergin B, Kapucu A, Demirci-Tansel C, et al. The renal microcirculation in sepsis. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:169e77.
8. Matejovic M, Ince C, Chawla LS, et al. Renal hemodynamics in AKI: in search of new treatment targets. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:49e58.
9. Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. *Am J Pathol* 2012;180:505e16.
10. Zafrani L, Payen D, Azoulay E, et al. The microcirculation of the septic kidney. *Semin Nephrol* 2015;35:75e84
11. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol* 2012;226:562e74.
12. Verma S, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2015;35(1):96e107.
13. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121:4210e21.
14. Molitoris B. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest* 2014;124: 2355e63.

15. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Ren Physiol* 2003;285(2):F191e8.
16. Molitoris BA, Sandoval RM. Kidney endothelial dysfunction: ischemia, localized infections and sepsis. *Contrib Nephrol* 2011;174:108e18.
17. Dennis JM, Witting PK, Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease, *Nutrients*, (2017); 9(7):718, Schütten MT, Houben AJ, de Leeuw PW, Stehouwer CD. The Link Between Adipose Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System Signaling and Obesity-Associated Hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2017 May;32(3):197-209. doi: 10.1152/physiol.00037.2016. PMID: 28404736.
18. Chen, G. et al. alpha-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* 553, 461–466 (2018).
19. Yuan Q, Ren Q, Li L, Tan H, Lu M, Tian Y, Huang L, Zhao B, Fu H, Hou FF, Zhou L, Liu Y. A Klotho-derived peptide protects against kidney fibrosis by targeting TGF- $\beta$  signaling. *Nat Commun*. 2022 Jan 21;13(1):438. doi: 10.1038/s41467-022-28096-z. PMID: 35064106; PMCID: PMC8782923.
20. Sureshbabu, A., Muhsin, S. A. & Choi, M. E. TGF-beta signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310, F596–F606 (2016).
21. Coppolino G, Leonardi G, Andreucci M, Bolignano D. Oxidative Stress and Kidney Function: A Brief Update. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4794-4799. doi: 10.2174/1381612825666190112165206. PMID: 30648504.
22. O'Connor PM. Renal oxygen delivery: Matching delivery to metabolic demand. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(10): 961-7.
23. Garg AX, Devereaux PJ, Yusuf S, et al. Kidney function after off-pump or on-pump coronary artery bypass graft surgery: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311(21):2191e8.
24. Vários autores: *Clínica Médica Vol. 5*. 2. ed. São Paulo: Manole Ltda., (2016). p. 366-368
25. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* (2016); 387:1377-96

26. Billings FT, Pretorius M, Schildcrout JS, et al, Obesity and Oxidative Stress Predict AKI after Cardiac Surgery, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, (2012); 23(7):1221-1228,
27. Peter N, Mittwede, Lusha Xiang, Silu Lu, John S, Clemmer, and Robert L, Hester, Oxidative stress contributes to orthopedic trauma-induced acute kidney injury in obese rats, *Am J Physiol Renal Physiol*, (2014); 308: F157–F163
28. Ohkawa H, Osishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxids in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-8.
29. Joris JTH Roelofs , Kasper MA Rouschop , Jaklien C. Leemans , Nike Claessen , Anita M. de Boer , Wilma M. Frederiks , H.Roger Lijnen , Jan J. Weening e Sandrine Florquin *JASN janeiro de 2006, 17 (1) 131-140; DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2005010089>*
30. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 378:804–814, 2011. doi:10.1016/S0140-6736(11)60813-1.
31. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyrén O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17:1695–1702, 2006. doi:10.1681/ASN.2005060638.
32. Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafter U. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F817–F822, 2000. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.5.F817.
33. Li J, Wu H, Liu Y, Yang L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim*. 2020 Aug 5;69(3):326-335. doi: 10.1538/expanim.19-0148. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32188837; PMCID: PMC7445062
34. Erstad BL, Nix DE. Assessment of Kidney Function in Patients With Extreme Obesity: A Narrative Review. *Ann Pharmacother* 55:80–88, 2021. doi:10.1177/1060028020935580.
35. Shang W, Wang Z. The Update of NGAL in Acute Kidney Injury. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(12):1211-1217. doi: 10.2174/1389203717666160909125004. PMID: 27634444.

36. Bagby SP. Obesity-initiated metabolic syndrome and the kidney: a recipe for chronic kidney disease? *J Am Soc Nephrol* 15:2775–2791, 2004. doi:10.1097/01.ASN.0000141965.28037.EE.
37. Ninomiya T, Kiyohara Y. Albuminuria and chronic kidney disease in association with the metabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2:104–107, 2007. doi:10.1111/j.1559-4294.2007.05734.x.
38. Druml W, Metnitz B, Schaden E, Bauer P, Metnitz PG. Impact of body mass on incidence and prognosis of acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Intensive Care Med* 36:1221–1228, 2010. doi:10.1007/s00134-010-1844-2.
39. Khakoo NS, Ioannou S, Khakoo NS, Vedantam S, Pearlman M. Impact of Obesity on Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2022 Jan;24(1):26-36. doi: 10.1007/s11894-022-00840-x. Epub 2022 Feb 12. PMID: 35150406.
40. Hall JE, Mouton AJ, da Silva AA, Omoto ACM, Wang Z, Li X, do Carmo JM. Obesity, kidney dysfunction, and inflammation: interactions in hypertension. *Cardiovasc Res* 117:1859–1876, 2021. doi:10.1093/cvr/cvaa336.
41. Bobulescu IA. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19:393-402, 2010. doi:10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac.
42. Laurentius T, Raffetseder U, Fellner C, Kob R, Nourbakhsh M, Floege J, Bertsch T, Bollheimer LC, Ostendorf T. High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. *J Inflamm (Lond)* 16:14, 2019. doi:10.1186/s12950-019-0219-x.
43. Chen B, Li R, Kubota A, Alex L, Frangogiannis NG. Identification of macrophages in normal and injured mouse tissues using reporter lines and antibodies. *Sci Rep* 12:4542, 2022. doi:10.1038/s41598-022-08278-x.
44. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79–83, 1999. doi:10.1006/bbrc.1999.0255.
45. Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Kita S, Minami S, Sakaue TA, Nakamura Y, Okita T, Kawachi Y, Fukada S, Namba-Hamano T, Takabatake Y, Isaka Y,

- Nishizawa H, Ranscht B, Maeda N, Shimomura I. Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320:E179–E190, 2021. doi:10.1152/ajpendo.00393.2020.
46. Mittwede PN, Xiang L, Lu S, Clemmer JS, Hester RL. Oxidative stress contributes to orthopedic trauma-induced acute kidney injury in obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 308:F157–F163, 2015. doi:10.1152/ajprenal.00537.2014.
47. Neyra JA, Hu MC, Moe OW. Klotho in Clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020 Dec 31;16(1):162-176. doi: 10.2215/CJN.02840320. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32699047; PMCID: PMC7792642.
48. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and kidney disease. *J Nephrol*. 2010 Nov-Dec;23 Suppl 16(Suppl 16):S136-44. PMID: 21170871; PMCID: PMC3227531.
49. Cui J, Yang Z, Wang J, Yin S, Xiao Y, Bai Y, Wang J. A cross-sectional analysis of association between visceral adiposity index and serum anti-aging protein Klotho in adults. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1082504. doi:10.3389/fendo.2023.1082504.
50. Izbeki F, Asuzu DT, Lorincz A, Bardsley MR, Popko LN, Choi KM, Young DL, Hayashi Y, Linden DR, Kuro-o M, Farrugia G, Ordog T. Loss of Kitlow progenitors, reduced stem cell factor and high oxidative stress underlie gastric dysfunction in progeric mice. *J Physiol* 588:3101–3117, 2010. doi:10.1113/jphysiol.2010.191023.
51. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol* 101:e67–e74, 2005. doi:10.1159/000086500.
52. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem* 389:233–241, 2008. doi:10.1515/BC.2008.028.
53. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem* 280:38029–38034, 2005. doi:10.1074/jbc.M509039200.
54. Canaud G, Bonventre JV. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30(4):575e83.

Artigo Submetido

1 **Obesity aggravates ischemia–reperfusion injury-induced**  
2 **acute kidney injury in mice**

3

4 **Igor O. da Silva,<sup>1</sup> Nicole K. de Menezes,<sup>1</sup> Heloisa D. Jacobina,<sup>1</sup> Antonio C. Parra,<sup>1</sup> Felipe L.**  
5 **Souza,<sup>2</sup> Leticia U. De Castro,<sup>1</sup> Joris Roelofs,<sup>3</sup> Alessandra Tammaro,<sup>3</sup> Samirah Abreu**  
6 **Gomes,<sup>2</sup> Talita R. Sanches,<sup>1</sup> and Lucia Andrade<sup>1</sup>**

7

8 <sup>1</sup>*Laboratory of Basic Science in Renal Diseases (LIM-12), Division of Nephrology, University of*  
9 *São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil;* <sup>2</sup>*Laboratory of Cellular Genetic and*  
10 *Molecular Nephrology, Division of Nephrology, University of São Paulo School of Medicine,*  
11 *São Paulo, Brazil;* and <sup>3</sup>*Department of Pathology, Amsterdam UMC, location AMC, University*  
12 *of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands*

13

14 **Running Head:** OBESITY AGGRAVATES IRI-INDUCED AKI

15

16 Correspondence: L. Andrade, Division of Nephrology, University of São Paulo School of  
17 Medicine, Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3310, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil (e-  
18 mail: lucia.andrade@fm.usp.br). Phone: +55 11 3061-7281; Fax: +55 11 3088-2267.

19

20 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

21 I.O.S., N.K.M., H.D. J., T.R.S., and L.A. conceived and designed research; I.O.S, N.K.M.,  
22 H.D.J., A.C.P., F.L.S., L.U.C, and T.R.S. performed experiments; I.O.S., N.K.M., H.D, J.,  
23 A.C.P, F.L.S., L.U.C., J.R., A.T., S.A.G., T.R.S., and L.A. analyzed data; I.O.S., N.K.M., H.D,



24 J., A.C.P, F.L.S., L.U.C., J.R., A.T., S.A.G., T.R.S., and L.A interpreted results of experiments;  
25 I.O.S., T.R.S., and L.A. prepared figures; I.O.S, T.R.S., and L.A. drafted manuscript; I.O.S,  
26 T.R.S., and L.A. edited and revised manuscript; I.O.S., N.K.M., H.D, J., A.C.P, F.L.S., L.U.C.,  
27 J.R., A.T., S.A.G., T.R.S., and L.A approved final version of manuscript.

28

29 **Abstract**

30 In critically ill patients, overweight and obesity are associated with acute respiratory distress  
31 syndrome and acute kidney injury (AKI). Although obesity is known to increase oxidative stress,  
32 worsen inflammation, and induce a state of Klotho deficiency, its effect on ischemia–reperfusion  
33 injury (IRI)-induced AKI is unknown. We hypothesized that obesity would aggravate renal IRI  
34 in mice. We fed mice a standard or high-fat diet for eight weeks. The mice were divided into four  
35 groups and submitted to sham surgery or IRI: obese, normal, normal+IRI, obese, and obese+IRI.  
36 All studies were performed 48 h after the procedures. Body weights were higher in the obese and  
37 obese+IRI groups than in the normal and normal+IRI groups, respectively. Serum glucose and  
38 cholesterol did not differ among the groups. Creatinine clearance also did not differ among the  
39 groups. Survival and urinary osmolality were lower in the obese+IRI group than in the  
40 normal+IRI group, whereas urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels, tubular  
41 injury scores, and caspase 3 expression were higher. In the obese+IRI group, the PCNA-positive  
42 cell counts were highest, as were the levels of oxidative stress (urinary levels of thiobarbituric  
43 acid-reactive substances and renal heme oxygenase-1 protein expression), and renal Klotho  
44 protein expression was lowest. Notably, macrophage infiltration was greater in the obese group  
45 mice than in the normal group mice, despite the fact that none of those mice were induced to  
46 AKI. In conclusion, greater oxidative stress might aggravate IRI in obese individuals, and Klotho  
47 could be a therapeutic target in those with AKI.

48

49 **NEW & NOTEWORTHY**

50 In critically ill patients, obesity increases the risk of acute kidney injury (AKI). However, its  
51 effect on ischemia–reperfusion injury (IRI)-induced AKI is unknown. Among mice with IRI-

52 induced AKI, we found that renal Klotho protein expression and survival were lower in those  
53 that were obese, whereas urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels and levels of  
54 oxidative stress were higher. The Klotho protein could be a therapeutic target in obese patients  
55 with AKI.

56

## 57 INTRODUCTION

58 Obesity is often a chronic, progressive disorder, leading to poor health and an increased risk  
59 of death. Worldwide, a high body mass index accounted for 4.72 million deaths and 148 million  
60 disability-adjusted life-years globally in 2017 and was the fourth leading risk factor for mortality  
61 in that same year (1). Obesity and oxidative stress are deeply interconnected. The increase in the  
62 quantity of adipose tissue leads to ectopic fat deposition in many organs, including the kidneys  
63 (2). The increased production of reactive oxidative species (ROS) and oxidative stress in adipose  
64 tissue can have various pathological manifestations (3). It has also been demonstrated that an  
65 increase in visceral adiposity is associated with a decrease in serum Klotho protein levels;  
66 therefore, obesity induces a state of Klotho deficiency (4). Obesity has been associated with AKI  
67 in intensive care unit patients and in patients recovering from surgery (5–8). In one systematic  
68 review and meta-analysis, the risk of AKI was found to be higher among patients who were  
69 overweight or obese than among those who had a normal body mass index (9). In addition,  
70 obesity is now considered an independent risk factor for chronic kidney disease (10, 11). During  
71 the coronavirus disease 2019 pandemic, obesity was found to be a risk factor for AKI and for  
72 AKI-related mortality (12–15).

73 Despite the fact that obesity is a known risk factor for AKI, there have, to our knowledge,  
74 been no animal studies demonstrating the role that obesity plays in renal ischemia–reperfusion  
75 injury (IRI)-induced AKI. We hypothesized that obesity would aggravate renal IRI in a  
76 Klotho/ROS-dependent pathway in mice.

77

## 78 METHODS

### 79 Experimental Design

80 All animal experiments were performed in accordance with the guidelines established by the  
81 Institutional Animal Care and Use Committee (Animal Ethics Committee, No. 1177/2018) of the  
82 University of São Paulo School of Medicine. Six-week-old male C57BL/6 mice were purchased  
83 from the animal facility of the University of São Paulo School of Medicine. Over an eight-week  
84 period, all mice were fed a high-fat diet (RH19532: protein 20.1%, carbohydrates 44.3%, fat  
85 18.9%, sodium 0.16%, potassium 0.38%, kcal/g 4.3; Rhoister, Araçoiaba da Serra, Brazil) or a  
86 standard diet (RH19521: protein 13.45%, carbohydrates 68.9%, fat 3.8%, sodium 0.14%,  
87 potassium 0.30%, kcal/g 3.6; Rhoister). The mice were randomly divided into four groups. Those  
88 in two of the groups were fed a standard diet for eight weeks, after which they were submitted to  
89 sham surgery (normal; n = 6), or renal artery clamping for 30 min (normal+IRI; n = 12). Those  
90 in the other two groups were fed a high-fat diet for eight weeks, thereafter being submitted to  
91 sham surgery (obese; n = 6), or renal artery clamping for 30 min (obese+IRI; n = 12). All studies  
92 were performed 48 h after sham surgery or IRI.

### 93 **Metabolic Cage Studies**

94 At baseline, at week 4, and at 24 h after sham surgery or IRI, the mice were moved to  
95 individual cages and maintained on a 12:12-h light-dark cycle with *ad libitum* access to water  
96 only (no food provided), to collect 24-h urine samples. At 48 h after IRI surgery, water intake  
97 was quantified and urine volume was measured. Animals were then anesthetized with  
98 intraperitoneal injections of ketamine (90 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body  
99 weight), after which blood samples were collected. The kidneys were removed immediately  
100 thereafter. Some kidneys were frozen in liquid nitrogen and stored at 70°C for subsequent  
101 immunoblotting. Renal tissues were also processed for immunohistochemistry and histological  
102 analyses. Biochemical analyses were performed in plasma and urine.

### 103 **Mouse Model of IRI**

104 Prior to IRI induction, mice were anesthetized with ketamine (90 mg/kg body weight) and  
105 xylazine (10 mg/kg body weight). The kidneys were exposed through a midline incision, after  
106 which both renal arteries were clamped for 30 min and released. The entire procedure was  
107 performed on a heated bed. The mice in the normal and obese groups were submitted to the same  
108 procedure without clamping of the arteries. At the end of the procedures, the mice were left to  
109 rest in isolated cages. The cages were kept on top of a heated blanket to maintain constant body  
110 temperatures. The mice were kept under surveillance until they showed signs of activity, at  
111 which point morphine (10mg/kg BW) was injected into the subcutaneous region behind the head  
112 to reduce postoperative pain and speed recovery. During the recovery period, we also added  
113 dipyrone to the drinking water (200 mg/kg BW). At 24 h after the surgical procedures, the mice  
114 were moved to metabolic cages, where they remained for an additional 24 h. All studies were  
115 performed 48 h after the surgical procedures.

### 116 **Analysis of Blood and Urine**

117 Urine and blood samples were centrifuged in aliquots for 30 min at 4,000 g. Serum and  
118 urinary levels of sodium and potassium were measured with an auto-analyzer (EasyLyte; Medica  
119 Corporation, Bedford, MA, USA). Creatinine was measured with a commercial kit (Creatinine  
120 kit; Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brazil). Creatinine clearance was calculated with the  
121 following formula:

$$122 \quad \text{Creatinine clearance} = [U_{\text{creat}} \times (U_{\text{volume}}/T)]/P_{\text{creat}}$$

123 where  $U_{\text{creat}}$  is the urinary concentration of creatinine (in mg/dL),  $U_{\text{volume}}$  is the urine volume (in  
124  $\mu\text{L}$ ),  $T$  is the time (in min), and  $P_{\text{creat}}$  is the plasma concentration of creatinine (in mg/dL).

125 **Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin**

126 Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) was measured by using a  
127 commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

128 **Western Blot Analysis**

129 *Kidney Fractions*

130 Kidney samples were homogenized as previously described (16). Homogenates were  
131 centrifuged at 4,000 ×g for 30 min at 4°C, to remove nuclei and cell debris. Protein in the  
132 supernatant was quantified by bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit no.  
133 23225; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

134 *Electrophoresis*

135 Kidney samples were run on polyacrylamide minigels. After transfer by electroelution to  
136 polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), blots were blocked  
137 with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline. Blots were then incubated overnight with  
138 antibodies against caspase 3 (1:500) and heme oxygenase-1 (HO-1, 1:1,000), both of which were  
139 obtained from ABCAM (Cambridge, UK). We visualized the labeling with a horseradish  
140 peroxidase-conjugated β-actin secondary antibody (1:100,000; Sigma-Aldrich, Burlington, MA,  
141 USA) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH, 1:1,000; Sigma-Aldrich), using  
142 enhanced chemiluminescence detection (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).  
143 We scanned the films with an imaging system (Alliance 4.2; UVItec, Cambridge, UK), after  
144 which we used densitometry to perform a quantitative analysis of the antibodies employed,  
145 normalizing the bands to β-actin and GPDH expression.

146 **Light Microscopy**

147 We stained 4- $\mu$ m paraffin sections with periodic acid Schiff–diastase. Tubular injury,  
148 characterized by loss of the renal brush border and cast formation, as well as tubular necrosis and  
149 dilation, was graded on the basis of the proportion of the corticomedullary region involved in 10  
150 randomly selected, non-overlapping high-power fields ( $\times 100$  magnification), on a five-point  
151 scale (17), as follows: 0 = none; 1 = 0–10%; 2 = 10–25%; 3 = 25–50%; 4 = 50–75%; and 5 =  
152 75–100%. For each animal, the total value is expressed as the tubular injury score.

### 153 ***Immunohistochemistry***

154 Histological sections of renal tissue were incubated for 1 h at room temperature with the  
155 following antibodies: anti-macrophage cell-surface protein 2 (anti-Mac-2, 1:300; Cerdalene  
156 Labs, Burlington, CA, USA); anti-Klotho (1:300; ABCAM); anti-PCNA (1:1,000; ABCAM);  
157 and anti-adiponectin (1:300; ABCAM). The reaction product was detected with a horseradish  
158 peroxidase-conjugated system (anti-rabbit polymer; Dako, Glostrup, Denmark), and the color  
159 reaction was developed with 3,3-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich). The histological sections  
160 for PCNA and Mac-2 were divided into 25 fields (0.087 mm<sup>2</sup> each; magnification,  $\times 400$ ), in  
161 which cells were counted, and the counts are expressed as cells/0.087mm<sup>2</sup>. Expression of  
162 adiponectin and Klotho was quantified by using a point grid overlaid onto the microscopy image.  
163 The result is expressed as the proportion of positively immunostained cells.

### 164 **Statistical Analysis**

165 Differences among the means of multiple parameters were analyzed by one-way analysis of  
166 variance, followed by the Kruskal–Wallis test. Comparisons between groups were analyzed by  
167 the Mann–Whitney test or Student’s t-test, as appropriate. Quantitative data are expressed as  
168 mean  $\pm$  SEM, and values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Survival curves



169 were compared by using a log-rank test. The statistical software used was GraphPad Prism,  
170 version 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

171

## 172 **RESULTS**

### 173 **Survival Curve**

174 Mortality was significantly higher in the obese+IRI group than in the normal+IRI and control  
175 groups. As illustrated in Figure 1, five (41.7%) of the 12 mice in the obese+IRI group died,  
176 compared with three (25.0%) of the 12 in the normal+IRI group. There were no deaths in the  
177 non-IRI groups.

### 178 **Body Weight**

179 At baseline, body weights did not differ significantly among the groups. As expected, body  
180 weights at week 4 were higher among the mice that were fed a high-fat diet. After eight weeks,  
181 body weights differed significantly between the mice fed a standard diet (in the normal and  
182 normal+IRI groups) and those fed a high-fat diet (in the obese and obese+IRI groups). That  
183 difference was still significant at 48 h after the surgical procedures (Table 1). There were no  
184 statistical differences among the groups in terms of the serum levels of cholesterol.

### 185 **Renal Function, Biochemical Analysis, and Histological Analysis**

186 At baseline and at week 4, there were no statistical differences among the groups in terms of  
187 urinary osmolality or in terms of the urinary excretion of sodium or potassium (data not shown).

188 At 48 h after the surgical procedures, creatinine clearance (used as a proxy for the glomerular  
189 filtration rate) did not differ significantly among the groups (Table 1). However, urinary  
190 osmolality was significantly lower in obese+IRI than in the normal and obese groups. Urinary  
191 NGAL expression were significantly higher in the normal+IRI and obese+IRI groups than in the

192 corresponding control groups, as well as being significantly higher in the obese+IRI group than  
193 in the normal+IRI group (Figure 2A).

194 Figures 2B and 2C show that the extent of renal tubular damage (expressed as the tubular  
195 necrosis score) was greater in the obese+IRI group than in the normal, obese, and normal+IRI  
196 groups ( $1.5 \pm 0.62$  vs.  $0.00 \pm 0.00$ ,  $0.00 \pm 0.00$ , and  $0.37 \pm 0.26$ , respectively;  $P < 0.05$  for all).  
197 Semiquantitative immunoblotting (Fig. 3, A and B) revealed that renal expression of caspase 3  
198 was significantly higher in the normal+IRI and obese+IRI group mice than in the normal and  
199 obese group mice ( $144.2 \pm 9.4$  and  $185 \pm 14.0\%$  vs.  $90.2 \pm 11.1$  and  $122 \pm 7.2\%$ , respectively;  $P$   
200  $< 0.01$ ). That expression was also significantly higher in the obese+IRI group than in the  
201 normal+IRI group ( $P < 0.05$ ).

## 202 **Obesity and the Inflammatory Response in AKI**

203 The number of PCNA-positive cells was significantly greater in the obese+IRI group than in  
204 the normal and obese groups ( $17.5 \pm 6.7$  cells/ $0.087 \text{ mm}^2$  vs.  $1.1 \pm 0.6$  and  $2.7 \pm 1.3$  cells/ $0.087$   
205  $\text{mm}^2$ , respectively;  $P < 0.05$ ). The PCNA-positive cell count in the normal+IRI group ( $11.2 \pm 4.2$   
206 cells/ $0.087 \text{ mm}^2$ ) did not differ significantly from those obtained for the other groups (Fig. 4, A  
207 and B).

208 It is noteworthy that, among the mice that were not induced to AKI, macrophage infiltration  
209 into the renal interstitium, expressed as the mean number of Mac-2+ cells, was higher in the  
210 obese group than in the normal group ( $8.4 \pm 1.7$  vs.  $1.0 \pm 0.24$  cells/ $0.087 \text{ mm}^2$ ;  $P < 0.05$ ). As  
211 expected, the mean Mac-2+ cell counts in the normal+IRI and obese+IRI groups ( $11.7 \pm 2.27$   
212 and  $8.3 \pm 1.74$  cells/ $0.087 \text{ mm}^2$ , respectively) were higher than that observed for the normal  
213 group ( $P < 0.05$ ; Fig. 5, A and B).

214 Renal expression of adiponectin (the proportion of positively immunostained cells) was  
215 lower in the obese and obese+IRI groups than in the normal and normal+IRI groups ( $36.0 \pm 8.9$   
216 and  $26.0 \pm 8.4\%$  vs.  $50.0 \pm 7.7$  and  $45.5 \pm 4.6\%$ , respectively; (Fig. 6, A and B). However, the  
217 difference was not significant.

### 218 **Obesity and Oxidative Stress in AKI**

219 Urinary levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were higher in the  
220 obese+IRI group than in the normal group (Table 1). The mean renal expression of HO-1 was  
221 higher in the obese+IRI group than in the normal and obese groups ( $162 \pm 19\%$  vs.  $96 \pm 8.6$  and  
222  $105 \pm 7.4\%$ , respectively;  $P < 0.001$ ), as well as being higher in the obese+IRI group than in the  
223 normal+IRI group ( $120 \pm 17.8\%$ ;  $P < 0.01$ ) and higher in the normal+IRI group than in the  
224 normal group ( $P < 0.05$ ; Fig. 7, A and B).

### 225 **Obesity and Renal Klotho Expression in AKI**

226 We found that that the mean proportion of cells showing positive immunostaining for Klotho  
227 was lower in the normal+IRI group than in the normal group ( $0.76 \pm 0.15$  vs.  $1.62 \pm 0.41\%$ ;  $P <$   
228  $0.05$ ). However, that difference was not significant in the comparison among all of the groups.  
229 Renal Klotho protein expression was also lower in the obese group than in the normal group  
230 ( $0.67 \pm 0.26$  vs.  $1.62 \pm 0.41\%$ ), although the difference was not significant in any of the analyses.  
231 The mean proportion of cells showing positive immunostaining for Klotho was lowest ( $0.21 \pm$   
232  $0.10\%$ ) in the obese+IRI group, the difference between that group and the normal and  
233 normal+IRI groups being significant ( $P < 0.05$ ; Fig. 8, A and B).

234

## 235 **DISCUSSION**

236 Here, we have demonstrated that obesity increased mortality in a mouse model of renal IRI.  
237 In addition, we found that there were no differences among the groups in terms of the glomerular  
238 filtration rate (creatinine clearance) at 48 h after IRI or sham surgery. However, obese+IRI group  
239 mice presented the lowest urinary osmolality, the highest urinary NGAL expression, the greatest  
240 renal tubular damage, and the highest caspase 3 expression. It is possible that obesity exerts  
241 those effects by upregulating oxidative stress molecules, as evidenced by the higher urinary  
242 TBARS levels and higher renal expression of HO-1 in our obese mice. It has long been known  
243 that renal IRI creates a state of decreased renal Klotho protein expression (18, 19). Accordingly,  
244 we observed markedly low levels of renal Klotho protein expression in our obese mice.

245 Obesity is recognized as a global epidemic and as a public health crisis in various countries  
246 (20), having also been shown to be an independent risk factor for the development of chronic  
247 kidney disease (11, 21). Although we found no differences among our groups of mice in terms of  
248 creatinine clearance, it is known that the determination of serum creatinine levels or even  
249 creatinine clearance is not the best means of estimating the glomerular filtration rate. There have  
250 been studies showing that tubular secretion of creatinine is higher among obese patients than  
251 among non-obese patients (22). However, to our knowledge, there have been no animal studies  
252 showing that obesity aggravates IRI-induced AKI. In the present study, we demonstrated that  
253 obesity leads to kidney damage, resulting in tubular necrosis and apoptosis, as well as greater  
254 urinary expression of NGAL. In a previous study, involving Zucker rats, the obese rats were  
255 found to develop AKI within the first 24 h after orthopedic trauma, although the same did not  
256 occur among the lean rats (23). In critically ill patients, obesity has also been shown to be an  
257 independent risk factor for the development of AKI, the risk of which was found to correlate  
258 directly with the body mass index (24). Obese patients often also have metabolic syndrome,

259 diabetes, dyslipidemia, hypertension, or cardiovascular disease (25, 26). In our mouse model of  
260 IRI-induced AKI, the animals did not develop diabetes or dyslipidemia. Therefore, we can  
261 speculate that the obesity *per se* might be an aggravating factor in IRI-induced AKI. Despite not  
262 having been submitted to IRI, the obese group mice showed higher Mac-2 inflammatory cell  
263 counts in renal tissue. Adipocytes store excess energy by undergoing hypertrophy. Visceral  
264 adipocytes undergo hypertrophy when storing additional lipids, becoming poorly vascularized  
265 and hypoxic, resulting in increased inflammatory cytokine production, immune cell infiltration,  
266 as well as cell stress and apoptosis (27). When that occurs, fat is stored in the kidneys, liver,  
267 pancreas, heart, skeletal muscle, and other tissues, leading to a condition known as lipotoxicity.  
268 Tissue-resident and infiltrating macrophages regulate the innate immune system, which plays a  
269 crucial role in inflammation in adipose tissue. It has been shown that macrophage activation and  
270 macrophage infiltration into adipose tissue are both more pronounced among patients who are  
271 obese (27). Lipids are a significant component in the normal kidney, accounting for  
272 approximately 3% of its wet weight (28). In a model of high-fat diet-induced obesity, Laurentius  
273 et al. (29) demonstrated that the number of infiltrating monocytes/macrophages was significantly  
274 higher in the kidneys of rats fed a high-fat diet than in those of rats fed a control diet. We found  
275 it interesting that, in our study, the Mac-2<sup>+</sup> cell counts were higher in the obese group than in the  
276 normal group, despite the fact that the mice in both of those groups underwent sham surgery (i.e.,  
277 were not induced to AKI), and that the obese+IRI group counts were comparable to those  
278 observed for the obese and normal+IRI groups. In the present study, an anti-Mac-2 antibody was  
279 used in order to identify macrophages in renal tissue. In the kidney, the antibody labeled a  
280 fraction of the CSF1R<sup>+</sup> and CX3CR1<sup>+</sup> macrophages but also stained tubular epithelial cells (30),  
281 which might have interfered with the identification of macrophage infiltration.

282 Serum levels of the protein adiponectin are lower in obese individuals, especially in those  
283 with visceral fat accumulation and altered lipid metabolism, which is paradoxical because  
284 adiponectin is derived from adipocytes (31). In another mouse model of acute IRI, Tsugawa-  
285 Shimizu et al. (32) detected adiponectin in the endothelium of the renal arterioles and in the  
286 peritubular spaces of the renal cortex, as well as in the inner and outer renal medulla. The authors  
287 found that there was more renal tubular damage and greater vascular permeability in  
288 adiponectin-knockout mice than in wild-type mice. They suggested that adiponectin, by binding  
289 to T-cadherin, plays a major role in preserving the capillary network and mitigating renal tubular  
290 injury (32). In the present study, renal expression of adiponectin was lower in the obese and  
291 obese+IRI groups than in the other groups, although the difference was not statistically  
292 significant. We believe that the lack of statistical difference was attributable to the great  
293 variability within the groups.

294 In a very elegant study, Cui et al. (4) analyzed the association between the visceral adiposity  
295 index and serum levels of the anti-aging protein Klotho protein, using (United States) National  
296 Health and Nutrition Examination Survey data. The authors found that, among adults in the  
297 United States, there was a non-linear association, as well as a dose-response relationship,  
298 between serum Klotho levels and the visceral adiposity index. They showed that there was a  
299 negative correlation between the two factors, albeit only when the visceral adiposity index below  
300 3.21. Among the individuals with a visceral adiposity index between 0.29 and 3.21, serum  
301 Klotho levels decreased as visceral adiposity increased, and those individuals were more prone to  
302 aging-related syndromes. In the present study, the mice that were fed a high-fat diet showed  
303 lower renal Klotho expression than did those that were fed a standard diet, although the  
304 difference was not statistically significant. Hu et al. (18) showed that IRI reduces Klotho in the

305 kidneys, urine, and blood of rodents. The mice in our normal+IRI group also presented lower  
306 renal Klotho protein expression than did those in our normal group. Nevertheless, that expression  
307 was much lower in our obese+IRI group. Therefore, we can surmise that obesity is a state of  
308 Klotho deficiency, which becomes much more pronounced when obese animals are submitted to  
309 IRI. Klotho deficiency has been shown to increase endogenous ROS generation and accentuate  
310 oxidative stress (33, 34). Conversely, overexpression of Klotho induces resistance to oxidative  
311 stress (19). In addition, Klotho administration has been shown to effectively reduce oxidative  
312 stress and preserve mitochondrial function in mice (35).

### 313 **Conclusions**

314 In obesity, increased oxidative stress might be the mechanism that aggravates IRI. In obese  
315 individuals with AKI, Klotho could be a therapeutic target.

316

### 317 **GRANTS**

318 This work was supported by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*  
319 (FAPESP, São Paulo Research Foundation; Grant no. 2020/12278-7) and by the *Laboratórios de*  
320 *Investigação Médica* (Medical Investigation Laboratories) of the *Faculdade de Medicina da*  
321 *Universidade de São Paulo* (University of São Paulo School of Medicine). I.O.S is the recipient  
322 of grant from the Brazilian National *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível*  
323 *Superior* (CAPES, Office for the Advancement of Higher Education; Grant no.  
324 88887.461455/2019-00). L. A. is the recipient of a grant from the Brazilian Conselho Nacional  
325 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and  
326 Technological Development; Grant 309683/2021-1). N.K.M., H.D.J. and A.C.P. are the  
327 recipients of grants from *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP,

328 São Paulo Research Foundation; Grant nos. 2018/23182-0, 2018/23183-7 and 2022/11975-1  
329 respectively).

330

### 331 **DISCLOSURES**

332 No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

### 333 **ACKNOWLEDGMENTS**

334 The authors are very grateful to Luciana Beatriz Andrade for her excellent work in the Graphical  
335 Abstract.

336

### 337 **REFERENCES**

- 338 1. **Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M,**  
339 **Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan CW, Brown JC, Friedman J, He J, Heuton**  
340 **KR, Holmberg M, Patel DJ, Reidy P, Carter A, Cercy K, Chapin A, Douwes-Schultz**  
341 **D, Frank T, Goettsch F, Liu PY, Nandakumar V, Reitsma MB, Reuter V, Sadat N,**  
342 **Sorensen RJD, Srinivasan V, Updike RL, York H, Lopez AD, Lozano R, Lim SS,**  
343 **Mokdad AH, Vollset SE, Murray CJL.** Forecasting life expectancy, years of life lost,  
344 and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and  
345 alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 392(10159):  
346 2052–2090, 2018. doi:10.1016/S0140-6736(18)31694-5.
- 347 2. **Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J.** Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev*  
348 *Immunol* 15: 351–369, 1997. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.351.
- 349 3. **Sena CM, Leandro A, Azul L, Seïça R, Perry G.** Vascular Oxidative Stress: Impact  
350 and Therapeutic Approaches. *Front Physiol* 9: 1668, 2018.  
351 doi:10.3389/fphys.2018.01668.
- 352 4. **Cui J, Yang Z, Wang J, Yin S, Xiao Y, Bai Y, Wang J.** A cross-sectional analysis of  
353 association between visceral adiposity index and serum anti-aging protein Klotho in  
354 adults. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1082504. doi:10.3389/fendo.2023.1082504.
- 355 5. **Thakar CV, Kharat V, Blanck S, Leonard AC.** Acute kidney injury after gastric  
356 bypass surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 426–430, 2007. doi:10.2215/CJN.03961106.



- 357 6. **Praga M, Hernández E, Herrero JC, Morales E, Revilla Y, Díaz-González R,**  
358 **Rodicio JL.** Influence of obesity on the appearance of proteinuria and renal insufficiency  
359 after unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 58:2111–2118, 2000. doi:10.1111/j.1523-  
360 1755.2000.00384.x.
- 361 7. **Glance LG, Wissler R, Mukamel DB, Li Y, Diachun CA, Salloum R, Fleming FJ,**  
362 **Dick AW.** Perioperative outcomes among patients with the modified metabolic syndrome  
363 who are undergoing noncardiac surgery. *Anesthesiology* 113:859–872, 2010.  
364 doi:10.1097/ALN.0b013e3181eff32e.
- 365 8. **Billings FT 4th, Pretorius M, Schildcrout JS, Mercaldo ND, Byrne JG, Ikizler TA,**  
366 **Brown NJ.** Obesity and oxidative stress predict AKI after cardiac surgery. *J Am Soc*  
367 *Nephrol* 23:1221–1228, 2012. doi:10.1681/ASN.2011090940.
- 368 9. **Steiber AL, Handu DJ, Cataline DR, Deighton TR, Weatherspoon LJ.** The impact of  
369 nutrition intervention on a reliable morbidity and mortality indicator: the hemodialysis-  
370 prognostic nutrition index. *J Ren Nutr* 13:186–190, 2003. doi:10.1016/s1051-  
371 2276(03)00078-5.
- 372 10. **Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafter U.** Glomerular  
373 hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F817–F822, 2000.  
374 doi:10.1152/ajprenal.2000.278.5.F817.
- 375 11. **Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyrén O.** Obesity  
376 and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17:1695–1702, 2006.  
377 doi:10.1681/ASN.2005060638.
- 378 12. **Bowe B, Cai M, Xie Y, Gibson AK, Maddukuri G, Al-Aly Z.** Acute Kidney Injury in a  
379 National Cohort of Hospitalized US Veterans with COVID-19. *Clin J Am Soc Nephrol*  
380 16:14–25, 2020. doi:10.2215/CJN.09610620.
- 381 13. **Chan L, Chaudhary K, Saha A, Chauhan K, Vaid A, Zhao S, Paranjpe I, Somani S,**  
382 **Richter F, Miotto R, Lala A, Kia A, Timsina P, Li L, Freeman R, Chen R, Narula J,**  
383 **Just AC, Horowitz C, Fayad Z, Cordon-Cardo C, Schadt E, Levin MA, Reich DL,**  
384 **Fuster V, Murphy B, He JC, Charney AW, Böttlinger EP, Glicksberg BS, Coca SG,**  
385 **Nadkarni GN; on behalf of the Mount Sinai COVID Informatics Center (MSCIC).**  
386 AKI in Hospitalized Patients with COVID-19. *J Am Soc Nephrol* 32:151–160, 2021.  
387 doi:10.1681/ASN.2020050615.
- 388 14. **Teoh JY, Yip TC, Lui GC, Wong VW, Chow VC, Ho TH, Li TC, Tse YK, Chiu PK,**  
389 **Ng CF, Hui DS, Chan HL, Szeto CC, Wong GL.** Risks of AKI and Major Adverse  
390 Clinical Outcomes in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome or Coronavirus  
391 Disease 2019. *J Am Soc Nephrol* 32:961–971, 2021. doi:10.1681/ASN.2020071097.

- 392 15. **Thakkar J, Chand S, Aboodi MS, Gone AR, Alahiri E, Schecter DE, Grand D,**  
393 **Sharma D, Abramowitz MK, Ross MJ, Dicipinigaitis P, Kapoor S.** Characteristics,  
394 Outcomes and 60-Day Hospital Mortality of ICU Patients with COVID-19 and Acute  
395 Kidney Injury. *Kidney360* 1:1339–1344, 2020. doi:10.34067/KID.0004282020.
- 396 16. **Silveira MAD, Capcha JMC, Sanches TR, de Sousa Moreira R, Garnica MS,**  
397 **Shimizu MH, Berretta A, Teles F, Noronha IL, Andrade L.** Green propolis extract  
398 attenuates acute kidney injury and lung injury in a rat model of sepsis. *Sci Rep* 11: 5925,  
399 2021. doi:10.1038/s41598-021-85124-6.
- 400 17. **Roelofs JJ, Rouschop KM, Leemans JC, Claessen N, de Boer AM, Frederiks WM,**  
401 **Lijnen HR, Weening JJ, Florquin S.** Tissue-type plasminogen activator modulates  
402 inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc*  
403 *Nephrol* 17:131–140, 2006. doi:10.1681/ASN.2005010089.
- 404 18. **Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW.** Klotho deficiency is an  
405 early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective.  
406 *Kidney Int* 78:1240–1251, 2010. doi:10.1038/ki.2010.328.
- 407 19. **Kuro-o M.** Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem* 389:233–  
408 241, 2008. doi:10.1515/BC.2008.028.
- 409 20. **Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML,**  
410 **Gortmaker SL.** The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local  
411 environments. *Lancet* 378:804–814, 2011. doi:10.1016/S0140-6736(11)60813-1.
- 412 21. **Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafter U.** Glomerular  
413 hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F817–F822, 2000.  
414 doi:10.1152/ajprenal.2000.278.5.F817.
- 415 22. **Erstad BL, Nix DE.** Assessment of Kidney Function in Patients With Extreme Obesity:  
416 A Narrative Review. *Ann Pharmacother* 55:80–88, 2021.  
417 doi:10.1177/1060028020935580.
- 418 23. **Mittwede PN, Xiang L, Lu S, Clemmer JS, Hester RL.** Oxidative stress contributes to  
419 orthopedic trauma-induced acute kidney injury in obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol*  
420 308:F157–F163, 2015. doi:10.1152/ajprenal.00537.2014.
- 421 24. **Druml W, Metnitz B, Schaden E, Bauer P, Metnitz PG.** Impact of body mass on  
422 incidence and prognosis of acute kidney injury requiring renal replacement therapy.  
423 *Intensive Care Med* 36:1221–1228, 2010. doi:10.1007/s00134-010-1844-2.

- 424 25. **Bagby SP.** Obesity-initiated metabolic syndrome and the kidney: a recipe for chronic  
425 kidney disease? *J Am Soc Nephrol* 15:2775–2791, 2004.  
426 doi:10.1097/01.ASN.0000141965.28037.EE.
- 427 26. **Ninomiya T, Kiyohara Y.** Albuminuria and chronic kidney disease in association with  
428 the metabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2:104–107, 2007. doi:10.1111/j.1559-  
429 4564.2007.05734.x.
- 430 27. **Hall JE, Mouton AJ, da Silva AA, Omoto ACM, Wang Z, Li X, do Carmo JM.**  
431 Obesity, kidney dysfunction, and inflammation: interactions in hypertension. *Cardiovasc*  
432 *Res* 117:1859–1876, 2021. doi:10.1093/cvr/cvaa336.
- 433 28. **Bobulescu IA.** Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*  
434 19:393–402, 2010. doi:10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac.
- 435 29. **Laurentius T, Raffetseder U, Fellner C, Kob R, Nourbakhsh M, Floege J, Bertsch T,**  
436 **Bollheimer LC, Ostendorf T.** High-fat diet-induced obesity causes an inflammatory  
437 microenvironment in the kidneys of aging Long-Evans rats. *J Inflamm (Lond)* 16:14,  
438 2019. doi:10.1186/s12950-019-0219-x.
- 439 30. **Chen B, Li R, Kubota A, Alex L, Frangogiannis NG.** Identification of macrophages in  
440 normal and injured mouse tissues using reporter lines and antibodies. *Sci Rep* 12:4542,  
441 2022. doi:10.1038/s41598-022-08278-x.
- 442 31. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K,**  
443 **Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S,**  
444 **Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.**  
445 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem*  
446 *Biophys Res Commun* 257:79–83, 1999. doi:10.1006/bbrc.1999.0255.
- 447 32. **Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Kita S, Minami S, Sakaue TA, Nakamura Y,**  
448 **Okita T, Kawachi Y, Fukada S, Namba-Hamano T, Takabatake Y, Isaka Y,**  
449 **Nishizawa H, Ranscht B, Maeda N, Shimomura I.** Increased vascular permeability and  
450 severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin  
451 or T-cadherin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320:E179–E190, 2021.  
452 doi:10.1152/ajpendo.00393.2020.
- 453 33. **Izbeki F, Asuzu DT, Lorincz A, Bardsley MR, Popko LN, Choi KM, Young DL,**  
454 **Hayashi Y, Linden DR, Kuro-o M, Farrugia G, Ordog T.** Loss of Kitlow progenitors,  
455 reduced stem cell factor and high oxidative stress underlie gastric dysfunction in progeric  
456 mice. *J Physiol* 588:3101–3117, 2010. doi:10.1113/jphysiol.2010.191023.

- 457 34. **Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H.** Oxidative stress  
458 decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol* 101:e67–  
459 e74, 2005. doi:10.1159/000086500.
- 460 35. **Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M,**  
461 **Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M.** Regulation of oxidative stress by  
462 the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem* 280:38029–38034, 2005.  
463 doi:10.1074/jbc.M509039200.

464

465 **Table 1.** *Body weight and biochemical parameters*

Parameter	Normal (n = 6)	Obese (n = 6)	Normal+IRI (n = 12)	Obese+IRI (n = 12)
BW at baseline	22.0 ± 1.2	22.0 ± 1.0	22.8 ± 0.9	22.7 ± 0.4
BW at week 4	25.7 ± 2.1	28.6 ± 2.1	26.0 ± 0.7	32.0 ± 0.6 <sup>a</sup>
Pre-procedure BW (g)*	28.6 ± 1.3	34.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	28.7 ± 0.9 <sup>c</sup>	36.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
Post-procedure BW (g) <sup>†</sup>	27.2 ± 1.4	33.3 ± 1.7 <sup>d</sup>	25.8 ± 9.1 <sup>e</sup>	32.0 ± 0.7 <sup>b,f</sup>
Serum cholesterol (mg/dL)	163 ± 26	166 ± 26	190 ± 18	196 ± 21
CrCl (mL/min/100 g BW)	0.40 ± 0.08	0.34 ± 0.06	0.20 ± 0.07	0.20 ± 0.05
Urine osmolality (mOsm/kg)	1,669 ± 625	2,648 ± 173	1,557 ± 144	1,084 ± 156 <sup>b,g</sup>
uNGAL/urinary Cr (µg/mL)	$5.7 \times 10^{-4} \pm 3.9 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-3} \pm 7.6 \times 10^{-4}$	0.09 ± 0.09 <sup>c,d</sup>	0.92 ± 0.74 <sup>c,d,h</sup>
uTBARS (nmol/mL)	530 ± 113	995 ± 196	723 ± 92	1,145 ± 158 <sup>b</sup>

466 IRI, ischemia–reperfusion injury; BW, body weight; CrCl, creatinine clearance; Cr, creatinine; uNGAL, urinary neutrophil gelatinase-  
467 associated lipocalin; uTBARS, urinary thiobarbituric acid-reactive substances.

468 \*After eight weeks of a standard or high-fat diet but before renal IRI or sham surgery.

469 <sup>†</sup>48 h after IRI or sham surgery.

470 <sup>a</sup>*P* < 0.0001 vs. normal and normal+IRI; <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. normal; <sup>c</sup>*P* < 0.01 vs. obese; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs. normal; <sup>e</sup>*P* < 0.0001 vs. obese; <sup>f</sup>*P* < 0.0001  
471 vs. normal+IRI; <sup>g</sup>*P* < 0.05 vs. obese; <sup>h</sup>*P* < 0.01 vs. normal+IRI.

472

473 **FIGURE LEGENDS**

474 **Figure 1.** Effects of obesity on survival after ischemia–reperfusion injury (IRI)-induced acute  
475 kidney injury (AKI).

476 **Figure 2.** Biochemical and histological analysis at 48 h after ischemia–reperfusion injury (IRI)  
477 or sham surgery. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin NGAL (A); Tubular injury  
478 score and kidney tissue sections stained with periodic acid-Schiff, by group (B and C,  
479 respectively).

480 **Figure 3.** Densitometric analysis and immunoblotting for caspase 3 (A and B, respectively).

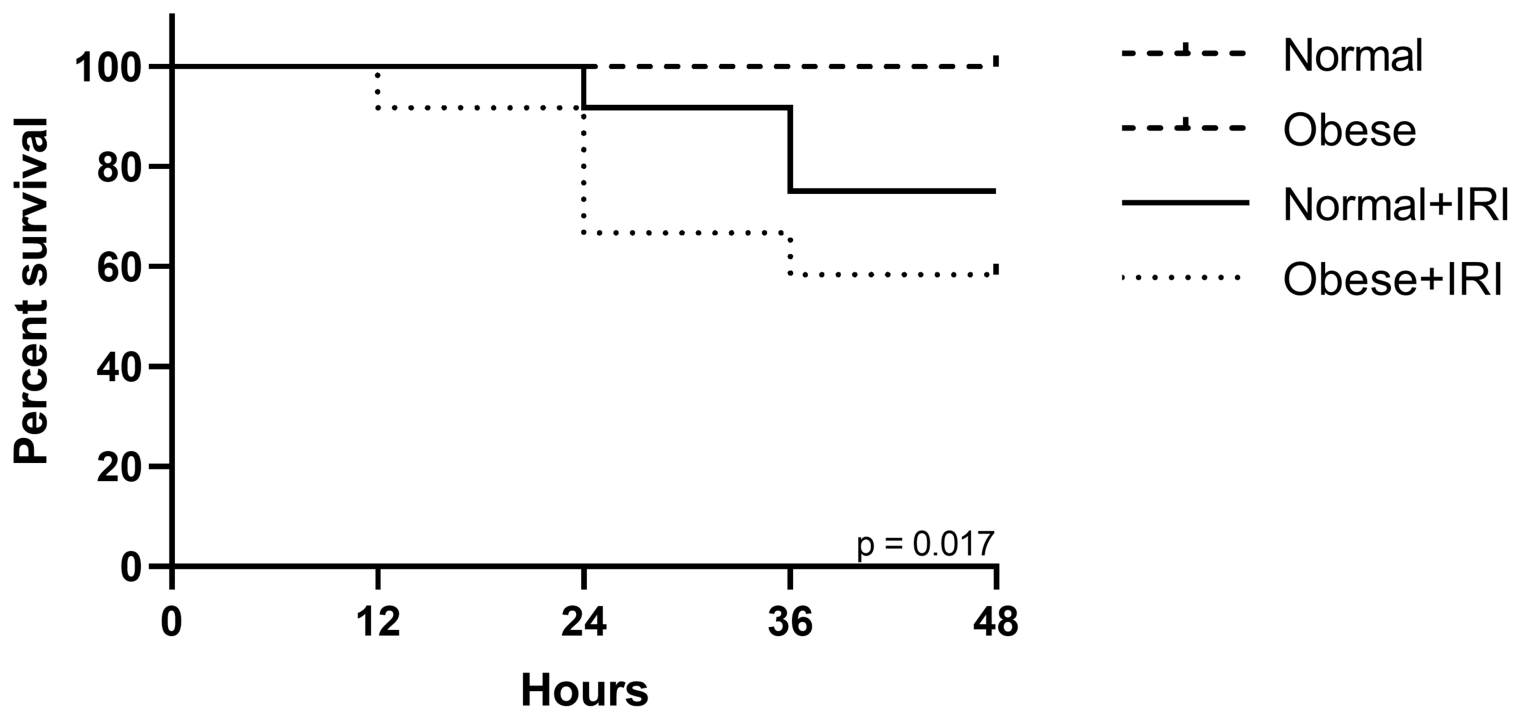
481 **Figure 4.** Immunohistochemical analysis of PCNA-positive cell expression in mouse kidney  
482 tissue. Scatter dot plot and immunostaining (A and B, respectively). Magnification, ×400.

483 **Figure 5.** Immunohistochemical analysis of macrophage cell-surface protein 2 (Mac-2)-positive  
484 cell expression in mouse kidney tissue. Scatter dot plot and immunostaining (A and B,  
485 respectively). Magnification, ×400.

486 **Figure 6.** Immunohistochemical analysis of adiponectin positivity in mouse kidney tissue.  
487 Scatter dot plot and immunostaining (A and B, respectively). Magnification, ×400.

488 **Figure 7.** Densitometric analysis and immunoblotting for heme oxygenase-1 (HO-1; A and B,  
489 respectively).

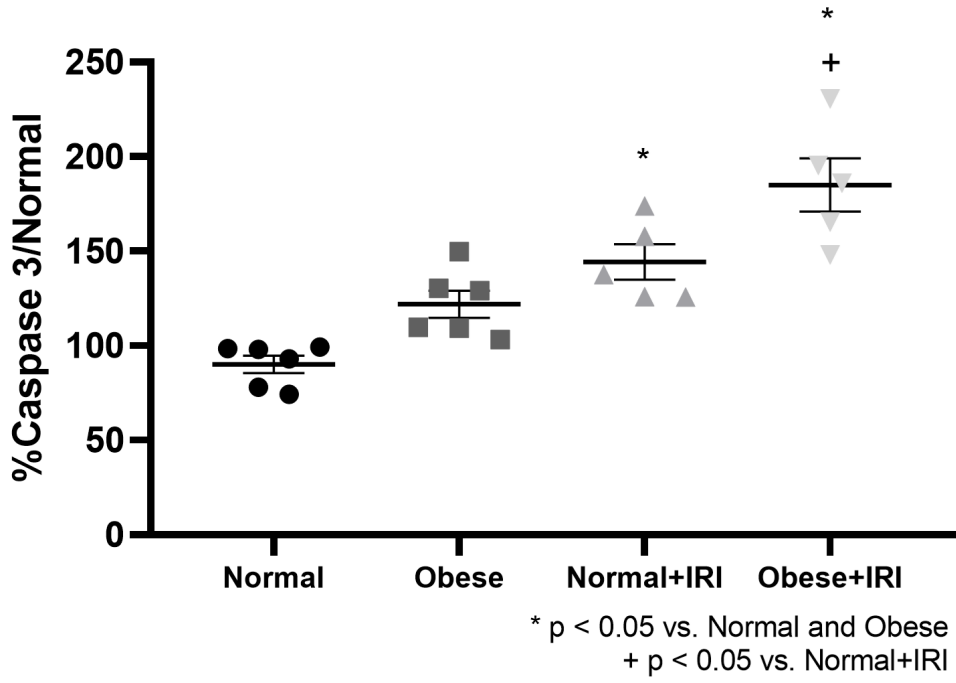
490 **Figure 8.** Immunohistochemical analysis of Klotho positivity in rat kidney tissue. Scatter dot  
491 plot and immunostaining (A and B, respectively). Magnification, ×400.



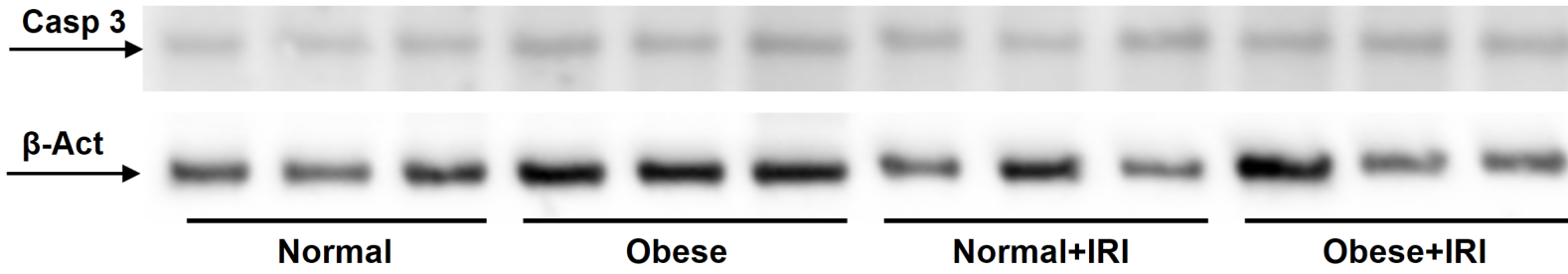




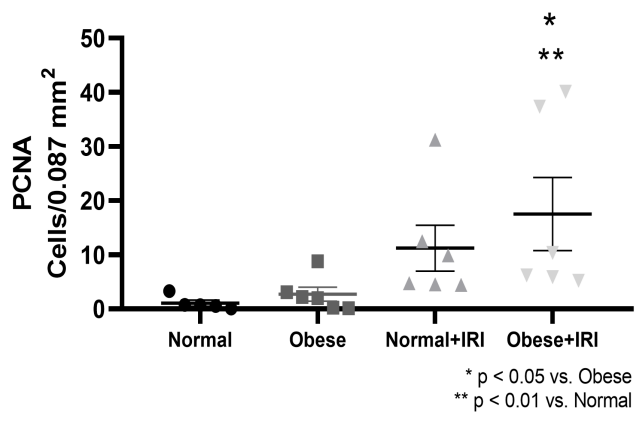
**A**



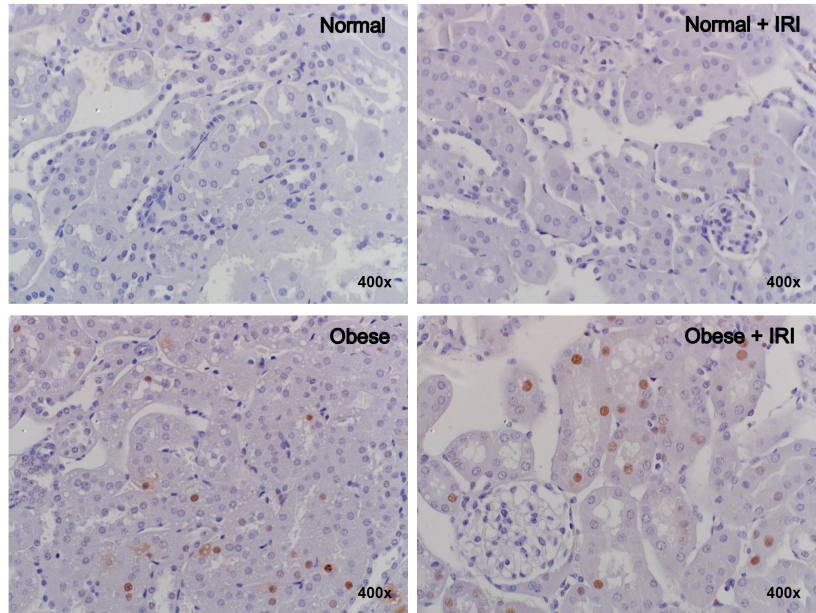
**B**

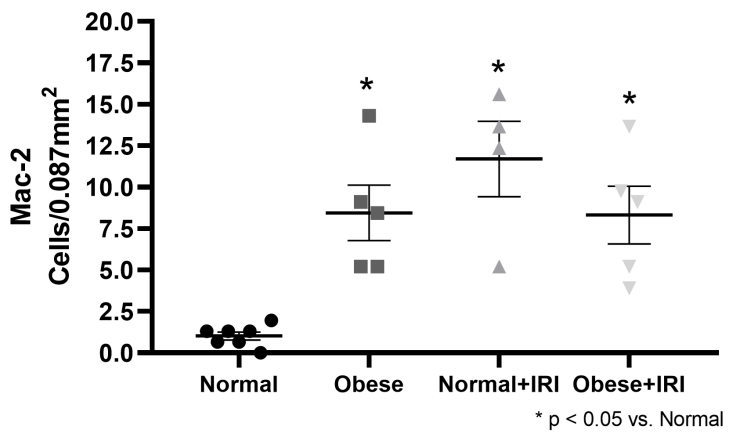
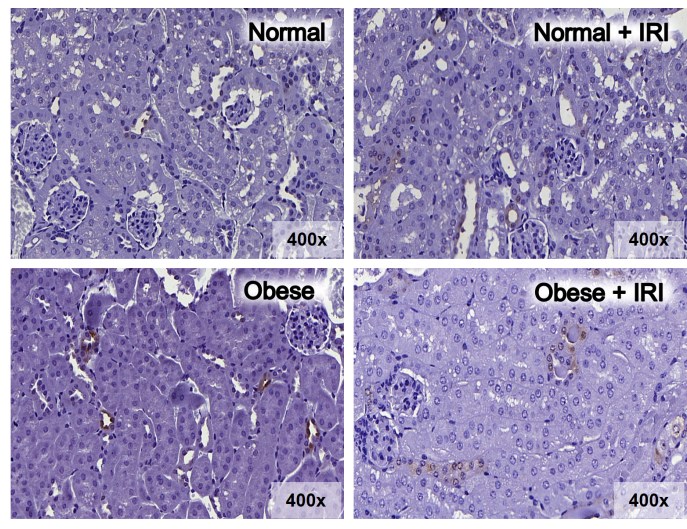


**A**

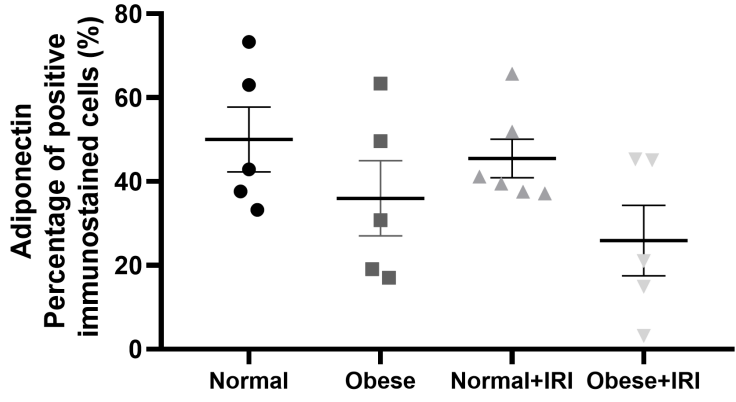


**B**

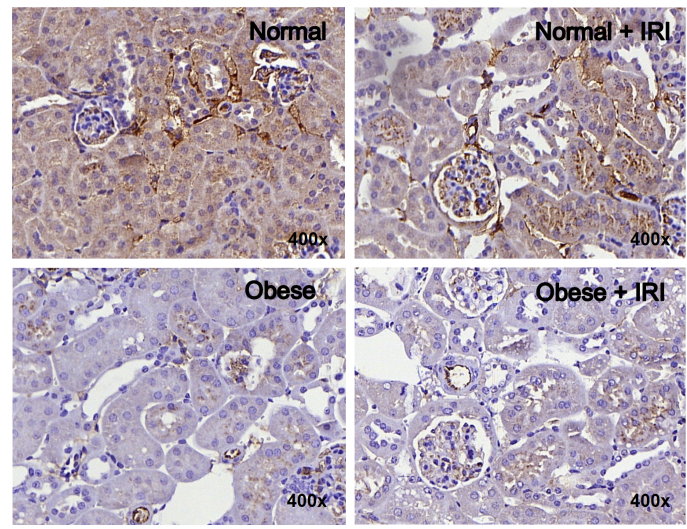


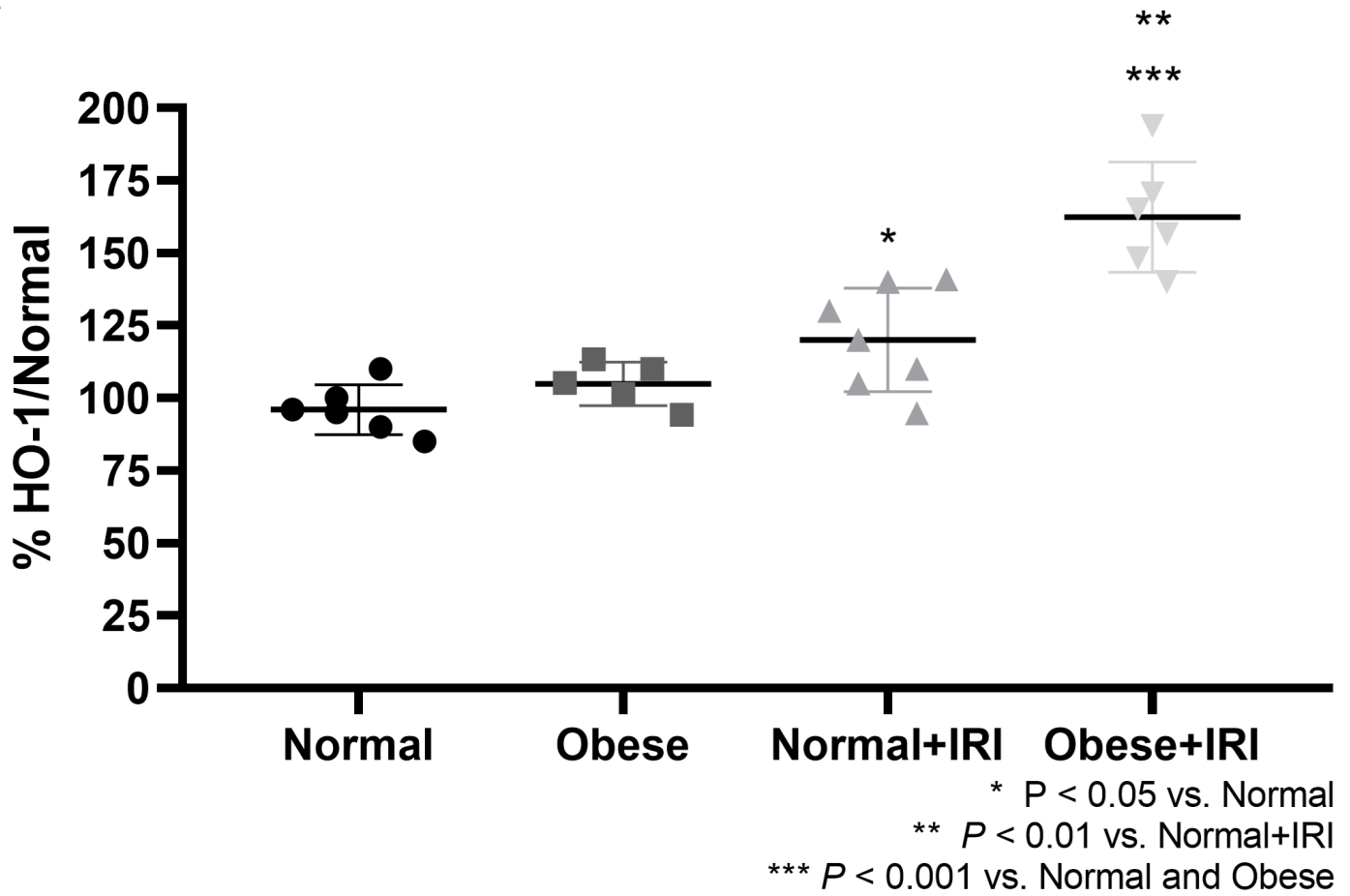
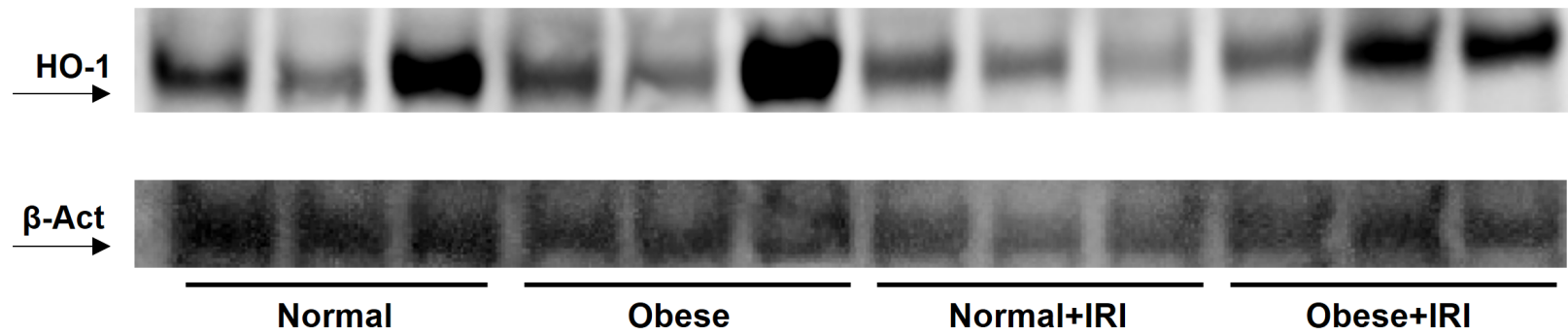
**A****B**

**A**



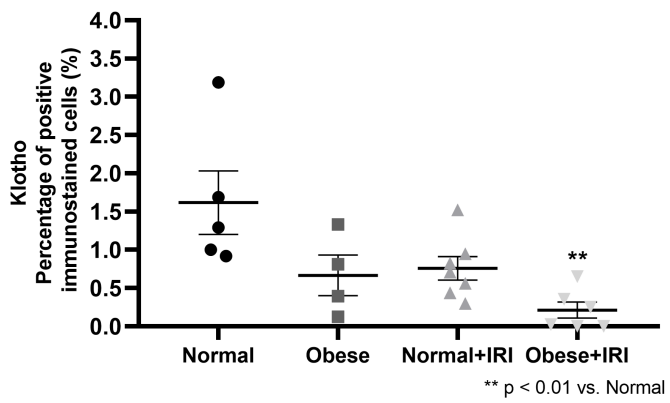
**B**



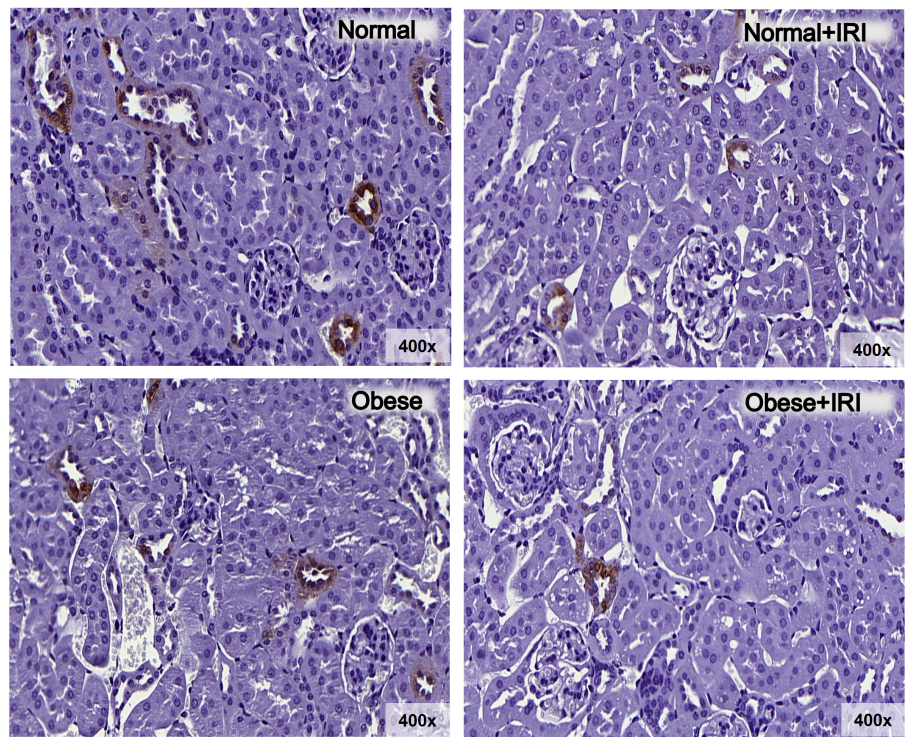
**A****B**



**A**

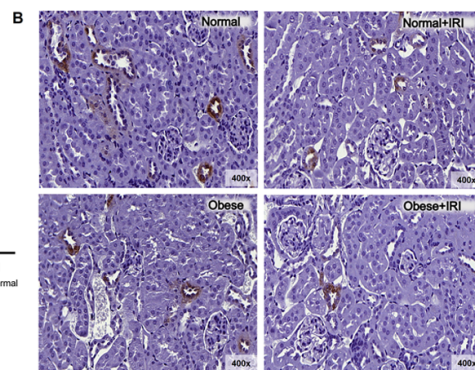
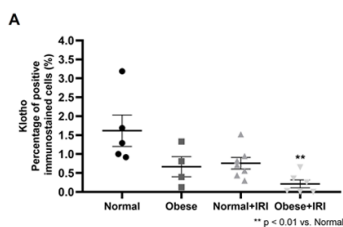
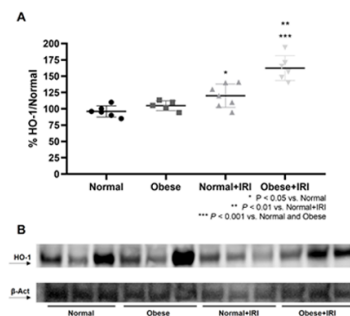
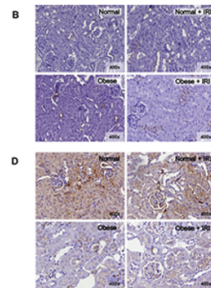
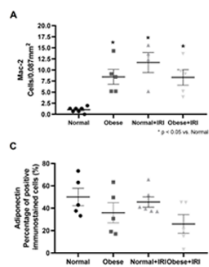
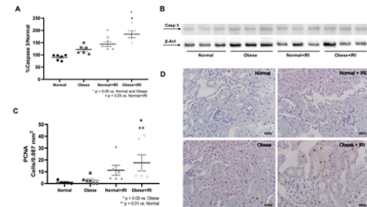
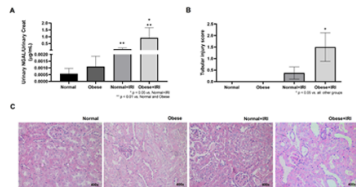
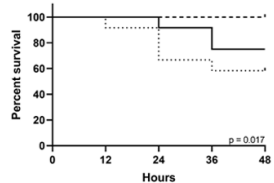
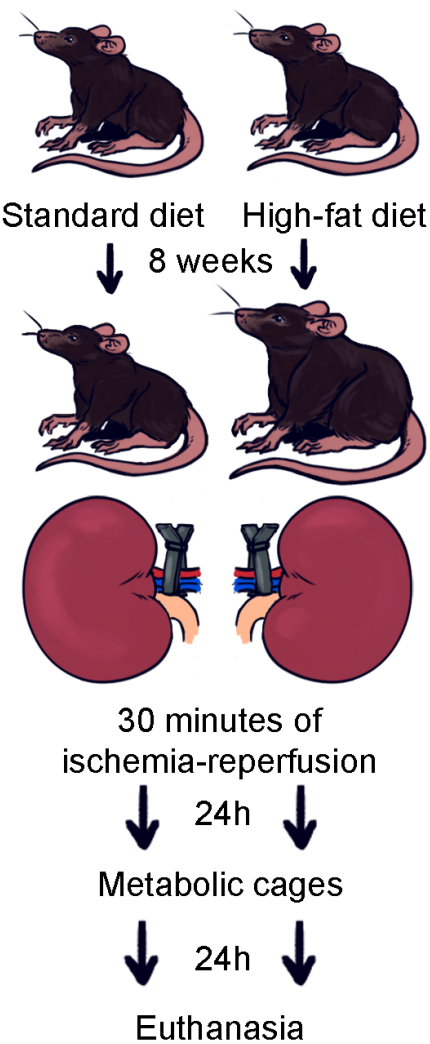


**B**



# OBESITY AGGRAVATES ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY IN MICE

## METHODS



## Conclusions

Increased oxidative stress in obesity might be the mechanism that aggravates ischemia-reperfusion injury-induced AKI. In obese individuals with AKI, Klotho could be a therapeutic target.